



Title	スタチン系薬物由来横紋筋融解症の発症機序ならびに発症リスク軽減に関する研究
Author(s)	小林, 正紀
Citation	北海道大学. 博士(薬学) 乙第6560号
Issue Date	2007-09-25
DOI	10.14943/doctoral.r6560
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/32603">http://hdl.handle.net/2115/32603</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	KobayashiMasaki.pdf



[Instructions for use](#)

# 学 位 論 文

スタチン系薬物由来横紋筋融解症の発症機序ならびに

発症リスク軽減に関する研究

Studies on statins-induced muscle damage:its mechanism and the  
risk-reducing method

小林 正紀

KOBAYASHI Masaki

北海道大学大学院薬学研究院

臨床薬剤学研究室

Laboratory of Clinical Pharmaceutics & Therapeutics, Division of  
Pharmasciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

## 目次

序論	1
第一章 スタチン系薬物による骨格筋細胞障害性	4
第一節 緒言	4
第二節 実験材料および実験方法	5
i) 使用薬物・試薬	5
ii) 細胞培養法	6
iii) MTT assay 法	6
iv) カスパーゼ活性測定法	7
v) 細胞内蓄積量測定法	7
第三節 実験結果	9
第一項 スタチン系薬物の骨格筋細胞生存率に及ぼす影響	9
第二項 スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性と アポトーシスの関連性	11
第三項 スタチン系薬物によるアポトーシスと 筋細胞内蓄積量との関連性	13
第四節 考察	14
第五節 まとめ	16

第二章	スタチン系薬物による筋障害機序	17
第一節	緒言	17
第二節	実験材料および実験方法	18
i)	使用薬物・試薬	18
ii)	細胞培養法	19
iii)	カスパーゼ活性測定法	19
iv)	DNA 抽出法	20
v)	細胞内 pH 測定法	21
vi)	細胞内乳酸量測定法	22
vii)	RT-PCR 法	22
viii)	MCT4 強制発現細胞の構築	24
ix)	Western blotting 法	25
x)	乳酸取り込み実験法	26
第三節	実験結果	27
第一項	スタチン系薬物誘導性アポトーシスにおける カスパーゼ経路の同定	27
第二項	スタチン系薬物誘導性アポトーシスと 細胞内酸性化との関連性	29
第三項	筋細胞における MCT4 を介した乳酸輸送と スタチン系薬物の阻害効果	31
第四節	考察	36
第五節	まとめ	39

第三章	スタチン系薬物による筋障害発症リスク軽減方法	40
第一節	緒言	40
第二節	実験材料および実験方法	42
i)	使用薬物・試薬	42
ii)	細胞培養法	42
iii)	MTT assay 法	42
iv)	細胞内 pH 測定法	42
v)	カスパーゼ活性測定法	42
vi)	細胞内コレステロール量測定法	43
vii)	血漿中 CPK 測定法	43
第三節	実験結果	44
第一項	スタチン系薬物による筋細胞アポトーシスに対する 炭酸水素ナトリウムの影響	44
第二項	スタチン系薬物による筋細胞アポトーシスに対する クエン酸の影響	48
第三項	横紋筋融解症モデルラットに及ぼすアルカリ化剤の影響	50
第四節	考察	52
第五節	まとめ	55
	総括	56
	参考論文	58
	謝辞	71

## 略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

BPB	bromophenol blue
BCECF-AM	biscarboxyethyl-carboxyfluorecsein acetoxymethylester
cDNA	complementary DNA
CHC	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CPK	creatine phosphokinase
CYP	cytochrome P450
DMEM	dulbeco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEPES	N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HUGO	The Human Genome Organisation
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration

K <sub>m</sub>	Michaelis constant
MCT	monocarboxylate transporter
2-ME	2-mercaptoethanol
MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, monohydrate
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
OATP	organic anion transporting polypeptide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1 Mixed, pH7.9
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
TE	tris 10 mM,/EDTA 1 mM
Tris	tris (hydroxymethyl)-aminomethane
V <sub>max</sub>	maximal velocity

## 序論

血液中の脂質としてコレステロール、中性脂肪、リン脂質、遊離脂肪酸の 4 種が存在するが、それらの中で高脂血症に関わるものは主にコレステロールと中性脂肪の 2 種と知られている。特にコレステロールは肝臓で合成され、ホルモン・ビタミンDなどの前駆体であること、および細胞膜の構成成分となることなど生命維持に重要な役割を果たしている。しかしながら、血液中のコレステロールが長期にわたって正常値を超えた状態にあることにより動脈硬化が進行し、冠動脈疾患や脳血管障害の発症につながることも知られている。HMG-CoA 還元酵素は、HMG-CoA からメバロン酸への変換反応を触媒するコレステロール生合成経路の律速酵素である。代表的な高脂血症治療薬であるスタチン系薬物は、本酵素を拮抗的に阻害し、コレステロール生合成の中間生成物であるメバロン酸の生成を抑制するため、強力な内因性コレステロール低下作用を有する。

これまでに 8 種のスタチン系薬物(セリバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン)が市販されており、高コレステロール血症に著効を示すとともに、近年心血管リスクを軽減させることが報告されている<sup>1-3)</sup>。

しかしながら、これら薬物の副作用の 1 つとして筋肉障害が知られている。筋肉障害の発症頻度は 1-7%であることが報告されており<sup>4)</sup>、重篤な場合には横紋筋融解症となることがある<sup>5,6)</sup>。横紋筋融解症とは、骨格筋細胞が急性に障害され、融解、壊死にいたる状態であり、筋細胞内のクレアチンホスホキナーゼ (CPK)およびミオグロビンが血中に逸脱する病態である。その発症原因は、虚血、過激な運動、外傷、低カリウム血症、代謝性アシドーシス、低リン血症など多



彩である。

スタチン系薬物のうちで最も脂溶性の高いセリバスタチンは、フィブラート系薬物との併用で横紋筋融解症による死亡例が報告され、2001年に自主回収となった<sup>7)</sup>。 *In vitro* 評価系での検討においても、セリバスタチンの細胞障害性は他のスタチン系薬物と比較して顕著に高いと報告されており<sup>8)</sup>、 *in vitro* 評価系による細胞障害性に関する検討が、横紋筋融解症の発症機序解明に有用な知見をもたらすものと考えられる。これまでに横紋筋融解症の発症機序に関しては種々検討されており、以下の三点について推察されている。

- 1) コエンザイム Q10 やユビキノンなどの代謝中間体の欠乏<sup>9,10)</sup>
- 2) アポトーシスの誘導<sup>11,12)</sup>
- 3) クロライドイオンチャネルの関与<sup>13,14)</sup>

しかしながら明確な発症機序に関しては不明な点も多く、スタチン系薬物間で筋障害を比較した例も少ない。さらには横紋筋融解症の発症リスク軽減を目的とした検討もほとんど行われていないのが現状である。

本研究では、ヒト骨格筋由来 RD 細胞およびラット骨格筋由来 L6 細胞を *in vitro* 骨格筋細胞モデルとして用い、すべてのスタチン系薬物の筋細胞障害性を比較することにより筋障害発症機序の解明を試みた。また、これらの知見をもとにスタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法を *in vitro* および *in vivo* の系を用いて評価した。

具体的には以下の課題について検討した。第一章では、8種のスタチン系薬物の物性と細胞障害性との関連性を明らかにし、各薬物間における障害性の比較を行った。一方でその細胞障害性とスタチン系薬物の細胞内蓄積性との関連についても検討を加えた。第二章では、スタチン系薬物による筋障害発症機序の解明を目的に、スタチン系薬物が誘導する筋障害性とアポトーシスの関連性に

ついて検討し、アポトーシス誘導機序についても検討を加えた。第三章では、スタチン系薬物による筋障害を抑制する物質の探索を目的に、第二章で明らかになった筋障害発症に関わる因子を抑制する物質をスタチン系薬物と併用することにより、その効果を *in vitro* および *in vivo* の系において評価した。

以上の検討により、スタチン系薬物の重篤な副作用である横紋筋融解症の発症機序および発症リスク軽減方法に関して有用な知見が得られたので以下に詳述する。

## 第一章 スタチン系薬物による骨格筋細胞障害性

### 第一節 緒言

骨格筋は、骨などと異なり豊富な血液供給を受けている臓器であるため、生体の基本組織の中では最も疾患に陥りにくい組織として知られている。高脂血症治療薬であるスタチン系薬物はこの骨格筋に対して障害を引き起こすが、明確な機序については不明である。

スタチン系薬物による筋障害の発症機序および薬物相互作用を詳細に検討する上で、*in vitro* 評価系は重要なツールになり得る。現在まで市販されているスタチン系薬物のうちで最も脂溶性の高いセリバスタチンは他のスタチン系薬物よりも横紋筋融解症を引き起こしやすいことが報告されているが、*in vitro* 評価系を用いた検討においても一致した結果が得られている<sup>8,15)</sup>。しかしながら各々のスタチン系薬物の障害の強さを同一評価系で比較した例は少なく、その時の筋細胞内蓄積量を検討した例はほとんどない。したがって、*in vitro* 評価系を用いてスタチン系薬物間の細胞障害性を比較することで、より安全な薬物選択の一助となることが想定される。ヒト骨格筋由来 RD 細胞およびラット骨格筋由来 L6 細胞は骨格筋の特性を有しており、骨格筋のモデル細胞として用いられている<sup>16,17)</sup>。そこで本章ではこれらの細胞を用いてスタチン系薬物の細胞障害性について詳細に検討を行った。スタチン系薬物の細胞障害性は細胞生存率、細胞形態変化ならびにカスパーゼ-3/7 活性を測定することにより評価した。また、各スタチン系薬物の細胞内蓄積量は HPLC を用いて定量し、薬物の物性と細胞障害性および細胞内蓄積量との関連性を考察したので以下に詳述する。

## 第二節 実験材料および実験方法

### i) 使用薬物・試薬

スタチン系薬物は以下の8種を用い、入手先を以下に示した。

Atorvastatin Ca	第一三共より原末提供
Cerivastatin Na	第一三共より原末提供
Fluvastatin Na	Novartis pharma より原末提供
Lovastatin	第一三共より原末提供
Pitavastatin Ca	興和創薬より原末提供
Pravastatin Na	第一三共より原末提供
Rosuvastatin Ca	第一三共より原末提供
Simvastatin	第一三共より原末提供

シンバスタチンおよびロバスタチンは活性体であるアシッド体に変換して実験に用いた。アシッド体への変換は0.05N NaOHにそれぞれ溶解し、20°C、30分間攪拌し、その後0.2N HClでpH7.4に調整することにより行った。

スタチン系薬物以外の試薬およびその入手先を以下に示した。

Caspase-Glo 3/7 assay	Promega
Cell culture lysis reagent	Promega
DMEM	SIGMA
FBS	ICN
MTT	Wako
Penicillin-streptomycin	ICN
Trypsin	Gibco BRL

## ii) 細胞培養法

骨格筋のモデルとして、ヒト骨格筋由来細胞 RD およびラット骨格筋由来細胞 L6 を用いた。両細胞の培養は、37°C-5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行い、非働化した 10% FBS、100 IU ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM を培養液とした。RD および L6 細胞を 75 cm<sup>2</sup> フラスコ(Coster、Corning Incorporated Corning)で培養し、播種後 4-5 日目に継代を行った。継代は、滅菌 PBS(Table I)で細胞を洗浄後、トリプシン溶液(0.25% trypsin、0.02% EDTA in PBS)により細胞を遊離させて行った。

Table I Composition of PBS

NaCl	8.0 g/L
KCl	0.2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.9 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g/L

## iii) MTT assay 法

MTT assay は、Mosmann らの方法に準拠した<sup>18)</sup>。細胞を 96well プレート (FALCON)に 50 µL/well ずつ播種し、37°C-5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解した薬物を 50 µL 添加し、一定時間培養を行った。培養後各 well に 0.5% MTT ストック溶液(滅菌 PBS に MTT を溶解して調製)を 10 µL ずつ添加し 4 時間反応させた。反応後に培養液を吸引除去し、DMSO を 200 µL 加えて細胞を溶解させた。溶解後マイクロプレートリーダー (densitometer CS9300、Shimazu)にて 590 nm の吸光度の測定を行い、生成した MTT formazan を定量した。

#### iv) カスパーゼ活性測定法

細胞を 12well プレート(Coster)に 1 mL/well ずつ播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解させた薬物を 1 mL 添加し、一定時間培養を行った。その後、セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離(2,900×g, 5 min) により細胞を回収した。回収した細胞を PBS (4°C) 1 mL で 2 回洗浄し、cell culture lysis reagent(Promega) 50 μL を加えて溶解し、cell lysate とした。Cell lysate を希釈しタンパク濃度を 10 μg/mL に調製後、この液 10 μL と Caspase-Glo-3/7(Promega)10 μL を 384well プレート(FALCON)上で混合し、250 rpm で 30 秒間振盪後、1 時間室温で反応させた。測定は、Wallac ARVO Sx-1420 multilabel counter(Perkin Elmer Life science)を用いて 1 秒あたりの発光シグナルを測定した。蛋白濃度の測定は Lowry らの方法に準拠した<sup>19)</sup>。

#### v) 細胞内蓄積量測定法

細胞を 12well プレート(Coster)に 1 mL/well ずつ播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3-4 日間培養を行った。コンフルエントに達した細胞から培養液を吸引除去し、37°C の transport medium (Table II) 1 mL で 2 回洗浄した後、transport medium を 1 mL 加え、37°C で 10 分間プレインキュベーションした。Transport medium を除去し、37°C の薬液(100 μM)を 1 mL 添加した。一定時間後に氷冷した transport medium 1 mL で 2 回洗浄し、反応を停止させた。氷冷した蒸留水 0.5 mL を加えて細胞を破碎、回収し、遠心分離(26,100×g, 5 min)後、上清を HPLC に注入した。HPLC 条件を Table III に示す。検量線用のサンプルは、細胞を transport medium(37°C) 1 mL で 2 回洗浄した後、各終濃度になるように調製した薬液 50 μL と蒸留水 450 μL を加えて調製した。検量線サンプルを遠心分離(26,100×g, 5 min)し、上清を HPLC に注入した。

Table II Composition of transport medium

NaCl	137 mM
D-glucose	25 mM
KCl	5.37 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	0.30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4.17 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.26 mM
MgSO <sub>4</sub>	0.80 mM
HEPES	10 mM

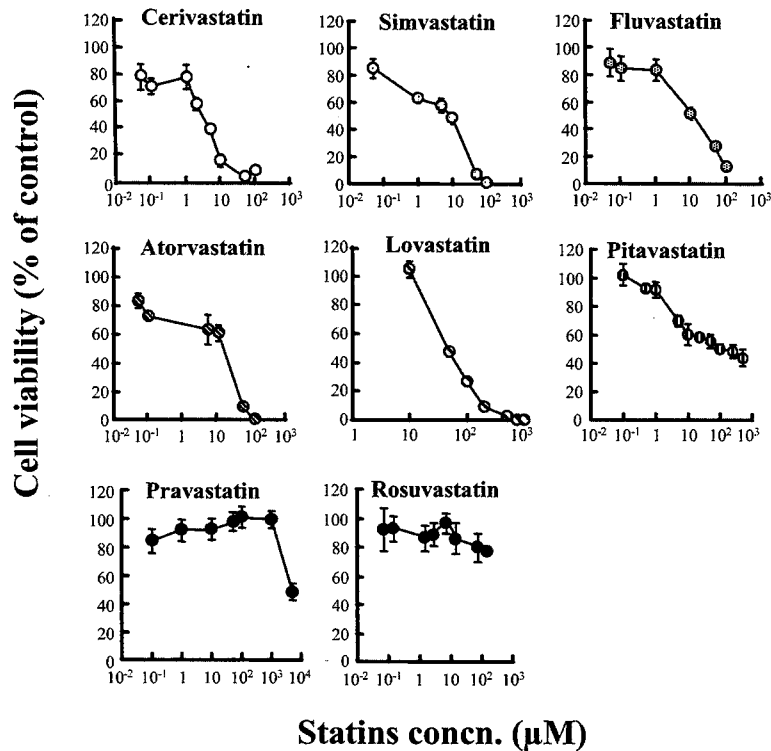
Table III HPLC condition

Column	Mightsil RP-8 GP (4.6 $\phi$ $\times$ 250 mm)
Column temperature	40°C
Mobile phase	cerivastatin, simvastatin- 2.5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> CN=1:4 fluvastatin, atorvastatin, lovastatin- 2.5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> CN=1:2 pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin- 2.5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> CN=1:1
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	238 nm

### 第三節 実験結果

#### 第一項 スタチン系薬物の骨格筋細胞生存率に及ぼす影響

まずはじめに、スタチン系薬物がヒト骨格筋由来 RD 細胞生存率に与える影響を検討した。



**Fig. 1. Effects of statins on viability of RD cells**

Cell viability was measured by the MTT assay. RD cells were exposed to various concentration of each statin for 48 hours. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3-18 determinations.

その結果、いずれのスタチン系薬物を用いた場合も、濃度依存的に RD 細胞の生存率が低下することが示された。その強さは、セリバスタチン > シンバスタチン > フルバスタチン > アトルバスタチン > ロバスタチン > ピタバスタチン >> プラバスタチン, ロスバスタチンの順であった(Fig.1)。このうちプラバスタチン, ロスバスタチンによる殺細胞効果は、他のスタチン系薬物と比べ非常に



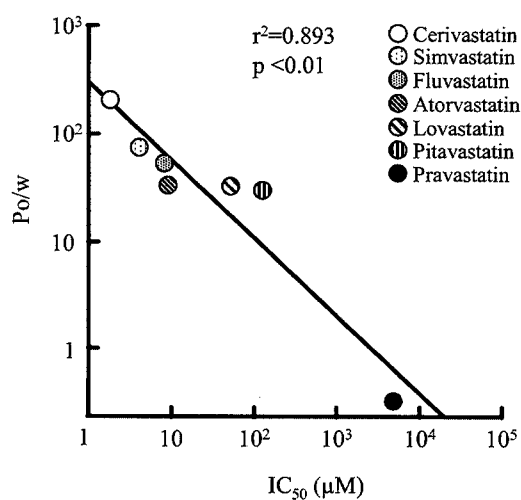
小さいものであった。

次にスタチン系薬物の物性と細胞障害性の関連性を探るため、Fig. 1 から算出された  $IC_{50}$  値と分配係数( $P_{o/w}$ )との関係について検討した。

**Table 1.**  
 **$IC_{50}$  values and partition coefficients ( $P_{o/w}$ ) of statins**

Statins	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	$P_{o/w}$
Cerivastatin	1.77	209.7
Simvastatin	3.99	76.0
Fluvastatin	8.34	54.0
Atorvastatin	9.26	34.0
Lovastatin	52.2	32.4
Pitavastatin	117	30.9
Pravastatin	4890	0.34
Rosuvastatin	N.D.	0.13

Data were taken from Fig. 1.



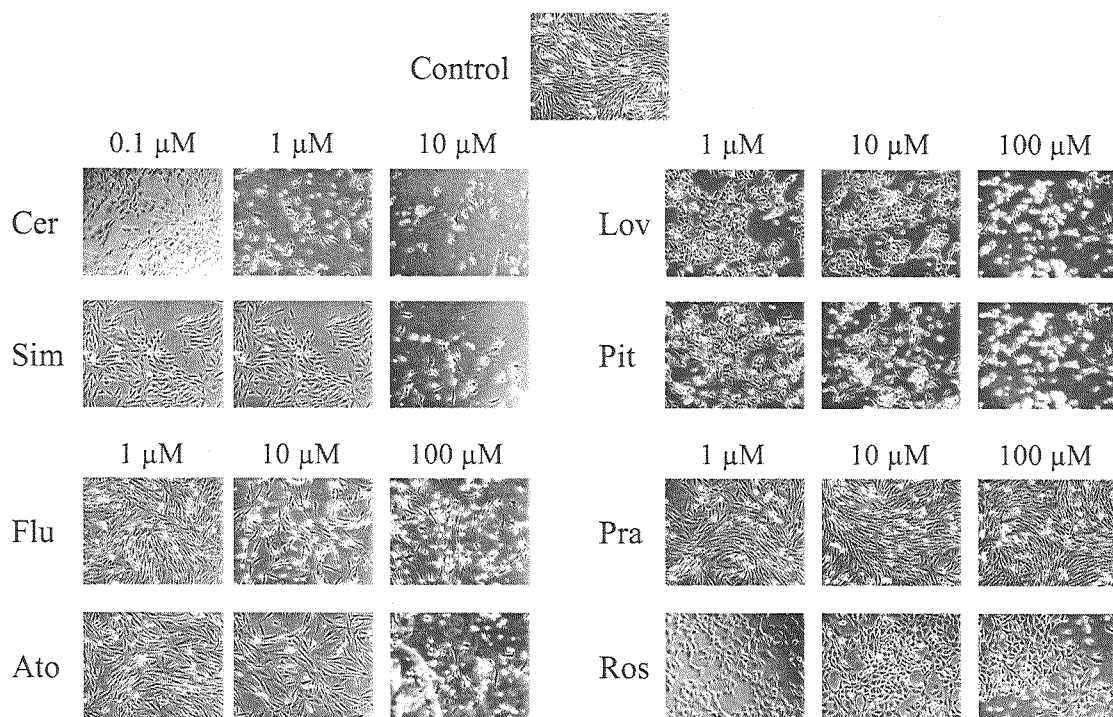
**Fig. 2. Correlation between growth inhibition and partition coefficients ( $P_{o/w}$ ) of statins**

その結果、スタチン系薬物それぞれの  $IC_{50}$  値と  $P_{o/w}$  には良好な相関が認められたことから本薬物の細胞障害は脂溶性が高いほど強いことが示唆された (Table 1, Fig. 2)。ロスバスタチンについては検討した濃度範囲において細胞障害がほとんど認められず  $IC_{50}$  値を算出できなかった。

次にスタチン系薬物による細胞障害の原因を明らかにすることを目的にスタチン系薬物曝露時の細胞形態変化観察を行った。細胞死の種類としてアポトーシスおよびネクローシスがあり、形態学的な特徴としてアポトーシスでは細胞の球状化が観察され、ネクローシスでは細胞の膨潤化が見られる。

## 第二項 スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性とアポトーシスの関連性

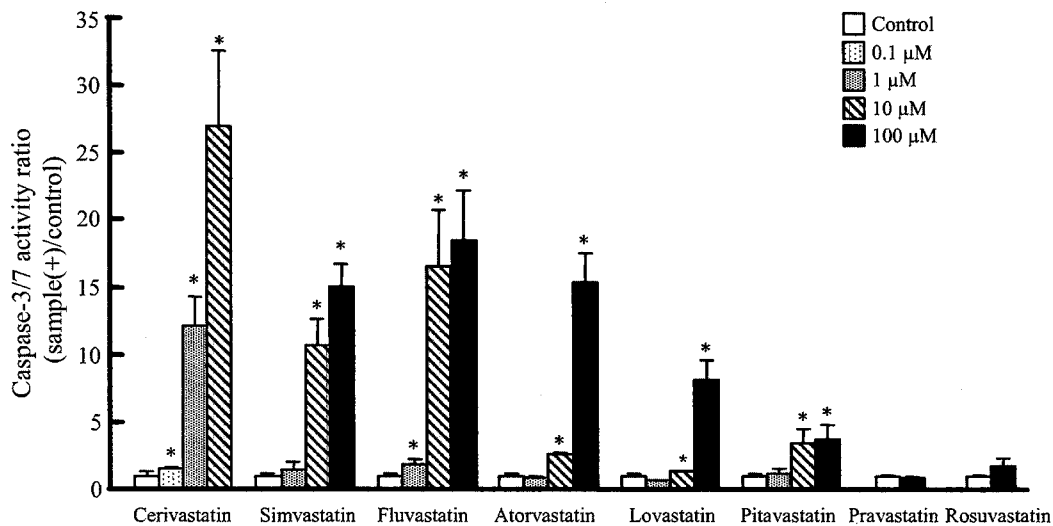
スタチン系薬物による筋障害のメカニズムを明らかにする目的で、スタチン系薬物曝露後の RD 細胞の形態観察を行った。



**Fig. 3. Morphological degeneration induced by statins in RD cells** (×100)

RD cells were exposed to various concentration of each statin for 48 hours.

その結果、生存率低下効果の強い、すなわち脂溶性の高いスタチン系薬物(セリバスタチン(Cer), シンバスタチン(Sim), フルバスタチン(Flu), アトルバスタチン(Ato), ロバスタチン(Lov), ピタバスタチン(Pit))においてアポトーシスの特徴である細胞の球状化が認められた。一方、水溶性の高いプラバスタチン(Pra)およびロスバスタチン(Ros)は形態に影響を与えないことが示された(Fig. 3)。この結果は、Fig. 1 の細胞生存率に与える影響とよく一致するものであった。そこで次にアポトーシスを生じた時に活性が上昇することが報告されているカスパーゼ-3/7 活性を測定することにより、これら薬物の細胞障害性にアポトーシスが関与している否かを検討した。



**Fig. 4. Effects of statins on caspase-3/7 activity ratio in RD cells**

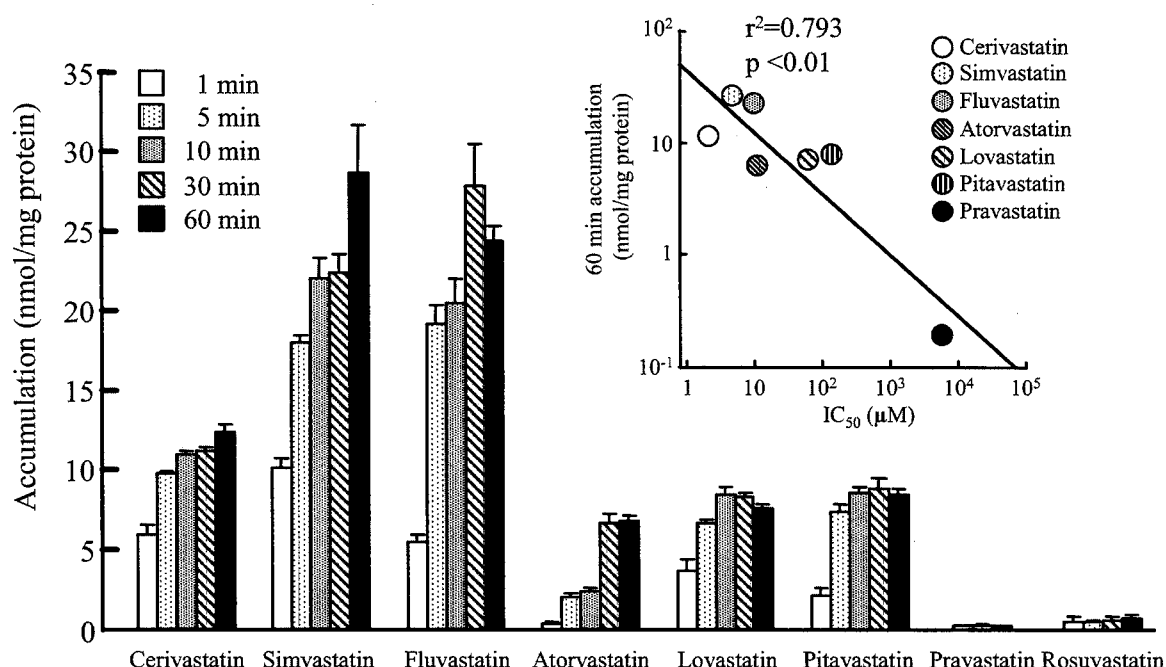
RD cells were exposed to various concentration of each statin for 48 hours, and the cell lysate was used to measure caspase-3/7 activity ratio. Each column represents the mean with S.D. of 3-18 determinations. \*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ .

その結果、細胞の球状化(Fig. 3)と同様に、脂溶性の高いスタチン系薬物曝露により有意なカスパーゼ-3/7の活性化が認められた(Fig. 4)。カスパーゼ-3/7活性に関しても  $IC_{50}$  値と同様に脂溶性と高い相関が認められたことから、スタチン系薬物による骨格筋細胞障害性にカスパーゼ-3/7の活性化を伴うアポトーシスが関与していることが明らかとなった。

スタチン系薬物による骨格筋細胞生存率の低下、細胞の球状化、カスパーゼ-3/7の活性化は、脂溶性が高いほど強いことが認められた。すなわち、スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性には薬物の脂溶性が関与していることが示唆された。一般的に脂溶性の高い薬物は細胞膜を透過しやすいこと、および組織に蓄積しやすいことが知られている。そこで次にスタチン系薬物の細胞障害性と細胞内蓄積量との関連を明らかにすることとした。

### 第三項 スタチン系薬物によるアポトーシスと筋細胞内蓄積量との関連性

骨格筋細胞障害性と筋細胞蓄積性との関連を明らかにするため、各スタチン系薬物の RD 細胞内蓄積量を測定した。



**Fig. 5. Accumulation of statins in RD cells**

The accumulation of each statin (100 μM) was measured at pH 7.4. Each column represents the mean with S.D. of 3-8 determinations. Insert: Correlation between 60-min uptake and growth inhibition of statins

その結果、スタチン系薬物の筋細胞内蓄積量は脂溶性に依存することが示され(Fig. 5)、スタチン系薬物の筋細胞内への取り込みには受動拡散の関与が大きいことが示唆された。また、スタチン系薬物の IC<sub>50</sub> 値と 60 分後の筋細胞内蓄積量には高い相関が認められた(Fig. 5, Insert)。この結果からスタチン系薬物の骨格筋細胞障害性は筋細胞内蓄積量と強く関連することが示唆された。

#### 第四節 考察

スタチン系薬物は副作用である筋障害発症のため、その使用を制限されることがある<sup>20-21)</sup>。したがって、スタチン系薬物の筋障害性の原因を明らかにすることは安全使用の観点から極めて重要である。そこでまずスタチン系薬物が筋細胞に与える影響を検討した。その結果、スタチン系薬物は骨格筋細胞数を濃度依存的に減少させ(Fig. 1)、さらにその筋細胞死には細胞の球状化ならびにカスパーゼ-3/7の活性化を伴うアポトーシスの関与が明らかとなった(Fig. 3-4)。これらの結果は、JohnsonらおよびSacherらの報告と一致した<sup>22,23)</sup>。

一方、スタチン系薬物による筋障害の一因として内因性コレステロール低下に伴うコエンザイム Q10の減少が示唆されている<sup>9,10)</sup>。Willisらはスタチン系薬物投与によりラット肝臓ならびに血漿中のコエンザイム Q10濃度が減少することを明らかにしている<sup>24)</sup>。またGhirlandaraらはヒトにおいてもコエンザイム Q10濃度が減少することを報告している<sup>25)</sup>。したがって、本実験系においてもスタチン系薬物の筋障害にコエンザイム Q10の欠乏が関与するか否かを検討した。スタチン系薬物とコエンザイム Q10を併用した時の細胞生存率を測定したところ、コエンザイム Q10による生存率の回復は認められなかった(データは示さない)。従ってスタチン系薬物の細胞障害にコエンザイム Q10の欠乏の関与は低いことが示唆された。この結果は、Rabkinの結果とよく一致するものであった<sup>26)</sup>。

スタチン系薬物それぞれの殺細胞効果の強さに着目したところ、その強さは、セリバスタチン > シンバスタチン > フルバスタチン > アトルバスタチン > ロバスタチン > ピタバスタチン >> プラバスタチン, ロスバスタチンの順であった。これは薬物の脂溶性と高い相関性を示し、本薬物の細胞障害は脂溶性が高いほど強いことが示唆された(Fig. 2, Table 1)。

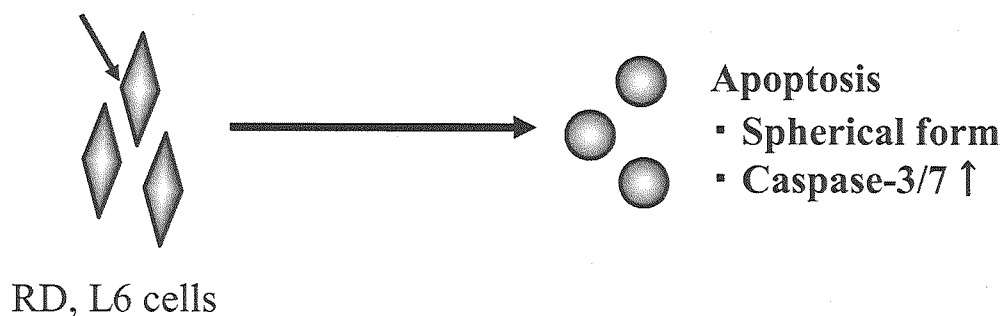
最も脂溶性の高いセリバスタチンは、コレステロール低下効果の高いスタチン系薬物として知られていたが<sup>27)</sup>、2001年にフィブラート系薬物であるゲムフィブロジルとの併用によって横紋筋融解症の発症例が報告され、自己回収となっている<sup>7)</sup>。本実験系においてもセリバスタチンの筋細胞障害性は顕著であり、毒性の強さを際立たせる形となった。今回、スタチン系薬物単剤の筋細胞に対する影響を検討し、スタチン系薬物は濃度依存的に細胞障害性を示すことを明らかにした。このことからスタチン系薬物の服用中、その血中濃度の上昇が認められる場合には、横紋筋融解症の発症リスクが増大することが示唆される。近年、CYP およびトランスポーターを介した薬物—薬物間相互作用により、スタチン系薬物による筋障害リスクが増大することが報告されている<sup>28-31)</sup>。今後薬物—薬物間相互作用の観点からも検討を行い、スタチン系薬物の安全使用の一助としたい。

またこれら薬物の筋細胞内蓄積量を測定したところ、筋細胞内蓄積量は薬物の脂溶性の高さに依存することが示され、スタチン系薬物の筋細胞内への取り込みには受動拡散の関与が高いことが示唆された。これまでスタチン系薬物の小腸吸収および肝取り込み機構には Organic anion transporting polypeptide (OATP) family が関与することが報告されている<sup>28, 32, 33)</sup>が、骨格筋細胞においては OATP family の関与は低いものと思われる。またスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下率を測定したところ、ピタバスタチン≧アトルバスタチン≧ロスバスタチン≧プラバスタチン≧フルバスタチン≧ロバスタチン≧セリバスタチン≧シンバスタチンの順であった(データは示さない)。以上の結果から、スタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下効果と副作用である筋障害性は相関しないことが示された。このことから HMG-CoA 還元酵素の阻害作用と細胞障害性は関連しないことが示唆された。

## 第五節 まとめ

スタチン系薬物による筋障害性については種々検討されているものの、同一評価系ですべてのスタチン系薬物の細胞障害性を検討し、それらを直接比較した例は少ない。そこで本章では、これまで市販されているすべてのスタチン系薬物を用いて筋細胞に与える影響を詳細に検討した。その結果、スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性には、細胞の縮小化およびカスパーゼ-3/7の活性化を伴うアポトーシスの関与が示された。またスタチン系薬物によるアポトーシス発生の強さは薬物の分配係数と高い相関性を示し、脂溶性の高い薬物ほど障害性が強いことが示された。さらにその障害性は、薬物の筋細胞内蓄積量に依存していることも明らかにした。一方、スタチン系薬物のコレステロール低下率の優劣と脂溶性および筋障害性の強弱は相関しなかった。スタチン系薬物は長期にわたって服用する薬物であることから、副作用発現の抑制を考慮した治療スケジュールを考案する上で、本知見は有益なものとなり得る。

### Statins



Statins-induced apoptosis is associated with their intracellular accumulation.

## 第二章 スタチン系薬物による筋障害機序

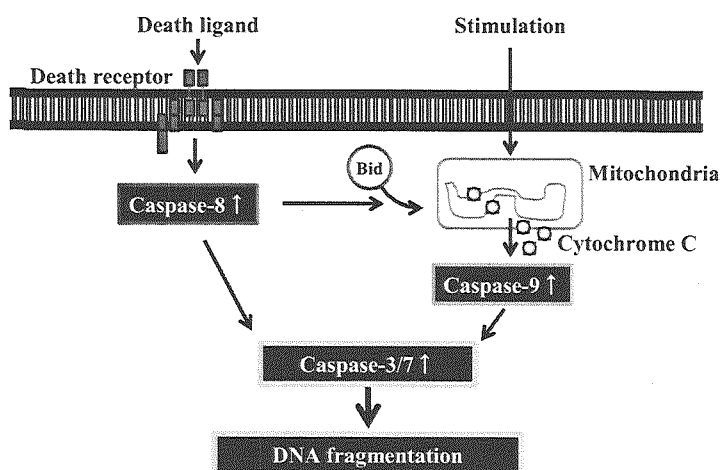
### 第一節 緒言

前章のとおり、スタチン系薬物による筋細胞障害性にはカスパーゼ-3/7の活性化を伴うアポトーシスが関与することが明らかになった。そこで本章ではこの機序をさらに詳細に解明するため種々の検討を行った。アポトーシス経路には、デスレセプターを介してカスパーゼ-8を活性化する経路とミトコンドリアを介してカスパーゼ-9を活性化する経路の二つの主要な経路が知られている<sup>34,35)</sup>。

またカスパーゼ-8は、Bcl-2 familyの一つであるBidのN末端の切断を介してミトコンドリアからのシトクロムc放出を促進することで、カスパーゼ-9の活性化に関与する。

いずれの場合も、最終的にカスパーゼ-3/7が活性化され、細胞

の球状化およびDNA断片化を特徴とするアポトーシスが引き起こされる。一方、近年小胞体ストレスによるカスパーゼ-12の活性化がアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>36)</sup>。そこでスタチン系薬物によるアポトーシスにはどちらの経路が関与しているのかを明らかにするために、カスパーゼ-8および-9の活性測定およびカスパーゼの阻害剤を用いてその経路の特定を試みた。さらにアポトーシス誘導因子である細胞内酸性化<sup>37-39)</sup>に着目し、その酸性化の原因を示唆するデータを得たので以下に詳述する。





## 第二節 実験材料および実験方法

### i) 使用薬物・試薬

第一章 第二節 i)で述べたものについては記載を省略した。

Antibiotic G-418 Sulfate	Promega
ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody	SIGMA
BCECF-AM	Wako
Blasticidin S Hydrochloride	Funakoshi
Caspase-Glo 8 assay	Promega
Caspase-Glo 9 assay	Promega
CHC	SIGMA
DNase I Amprification Grade	Invitrogen
ECLTM Western blotting detection reagent	Amersham Pharmacia Biotech
EcoR I	NEW ENGLAND BioLabs
Ethidium Bromide Solution	QIAGEN
Goat anti-mouse IgG1-HRP	Santa Cruz Biotechnology
HotStarTaq PCR	QIAGEN
L-[ <sup>14</sup> C] Lactic acid sodium salt	Amersham
L-Lactic acid sodium salt	ICN
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen
Mouse anti-actin monoclonal antibody	CHEMICON
Nigericin	Wako
Omniscript RT Kit	QIAGEN

pcDNA3.1/zeo(+)	Invitrogen
PCI	Nacalai tesque
pCI-neo	Promega
pGEM® T-easy vector	Promega
Phroletin	SIGMA
Proteinase K	QIAGEN
RNAeasy mini kit	QIAGEN
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
Sal I	NEW ENGLAND BioLabs
Xho I	NEW ENGLAND BioLabs
Z-Leu-glu(OMe)-Thr-Asp(OMe) Fluoromethyl Ketone	SIGMA

## ii) 細胞培養法

第一章 第二節 ii)で述べたものについては記載を省略した。

MCT4 強制発現細胞を作製するにあたり、宿主細胞としてブタ腎近位尿細管上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞を用いた。細胞の培養は、37°C-5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行い、非働化した 10% FBS、100 IU ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む Medium199 を培養液とした。LLC-PK1 細胞を 75 cm<sup>2</sup> フラスコ (Coster, Corning Incorporated Corning) で培養し、播種後 4-5 日目に継代を行った。継代は、滅菌 PBS (Table I) で細胞を洗浄後、トリプシン溶液(0.25% trypsin、0.02% EDTA in PBS)により細胞を遊離させて行った。

## iii) カスパーゼ活性測定法

第一章 第二節 iv)で述べた。

#### iv) DNA 抽出法

細胞を 10 cm ディッシュに播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解させた薬物を添加し、一定時間培養を行った。その後、セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離(1,600×g, 5 min)により細胞を回収した。回収した細胞を PBS(4°C)により 2 回洗浄後、遠心分離(1,600×g, 5 min)により得られた細胞に lysis buffer(TableIV) 0.5 mL を加えて、十分に細胞を破碎した。細胞破碎液に PCI を 0.5 mL 加えて 1 分間転倒混和し、遠心分離(26,100×g, 10 min)によって水相を分取した。水相の 2.5 倍容量のエタノールと 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えて、1 分間転倒混和し、-20°C で 15 分静置した。その後、遠心分離(40,800×g, 10 min)により沈殿を回収し、70%エタノールを 200 μL 加えて洗浄した。遠心分離(40,800×g, 5 min)を行い、沈殿を回収し、得られた沈殿に TE buffer(Tris 10 mM, EDTA 1 mM)0.5 mL を加えて溶解した。次に RNase を終濃度 0.5 μg/mL となるように加え、50°C で 1 時間インキュベーションした。この溶液に、PCI 0.5 mL を加えて 1 分間転倒混和し、遠心分離(26,100×g, 10 min) によって水相とフェノール相に分離し、水相を分取した。水相の 2.5 倍容量のエタノールと 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えて、1分間転倒混和し、-20°C で 15 分以上静置した。遠心分離(40,800×g, 10 min)して沈殿を回収し、70%エタノールを 200 μL 加えて洗浄した。遠心分離(40,800×g, 5 min)により沈殿を回収し、得られた沈殿を風乾後、TE buffer を適宜加えて溶解し、DNA 抽出液とした。DNA 抽出液は、260 nm における吸光度から下記の式に従って DNA 濃度を計算した。DNA 20 μg 相当量の抽出液に loading dye を加えて、2% アガロースゲル電気泳動(100V, 60 min)を行った。電気泳動の画像撮影および記録は、ATTO printgraph、ATTO imageSaver AE-6905C を用いた。

$$\text{DNA concn.} = \text{O.D.260 nm} \times \text{dilution rate} \times 50 (\mu\text{g/mL})$$

TableIV Composition of lysis buffer

EDTA·2Na	10 mM
NaCl	200 mM
Proteinase K	0.1 mg/mL
TritonX-100	0.2 %
Tris-HCl (pH 7.4)	10 mM

v) 細胞内 pH 測定法

細胞内 pH 測定は、Boyarsky らの方法に準拠した<sup>40)</sup>。細胞を 12well プレート (Coster) に播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解させた薬物を添加し、一定時間培養を行った。遠心分離 (10,200×g, 5 min) により細胞を回収した。回収した細胞を PBS(4°C) 1 mL で 2 回洗浄し、HEPES buffer (Table V) 0.5 mL に懸濁した。BCECF-AM solution を終濃度 3 μM になるように加えて、37°C で 30 分間インキュベーションした。HEPES buffer で 1 回洗浄後、HEPES buffer 1 mL に懸濁した。細胞懸濁液を 12well プレート (Coster) に移し、励起波長 485 nm あるいは 450 nm、蛍光波長 535 nm で測定した。検量線については、BCECF-AM solution を負荷した細胞を pH 6.6-8.0 に調整した calibration buffer (Table VI) 1 mL にそれぞれ懸濁し、ナイジェリシンを終濃度 10 μg/mL となるように加え、10 分間インキュベーションした後 12well プレート (Coster) に移し、励起波長 485 nm あるいは 450 nm、蛍光波長 535 nm で測定した。

Table V HEPES buffer		Table VI Calibration buffer	
D-glucose	5 mM	NaCl	10 mM
HEPES	20 mM	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
KCl	5 mM	Na-MOPS	10 mM
NaCl	153 mM	KCl	130 mM

#### vi) 細胞内乳酸量測定法

細胞を 12well プレート(Coster)に播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解させた薬物を添加し、一定時間培養を行った。その後、セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離(10,200 ×g, 5 min)により細胞を回収した。回収した細胞を PBS (4°C) 1 mL で 2 回洗浄し、cell culture lysis reagent(Promega) 50 μL に溶解し、cell lysate とした。溶解液と Lactate Reagent (乳酸酸化酵素、ペルオキシダーゼ、chromogen precursor を含む) を 1:100 で反応させた。反応液を 96well プレートに移し、マイクロプレートリーダー(densitometer CS9300、Shimazu)にて 540 nm の吸光度の測定を行った。

#### vii) RT-PCR 法

##### 1) 骨格筋細胞からの total RNA 抽出

細胞から RNAeasy mini Kit、RNase-Free DNase Set、DNase I Amprification Grade を用いて total RNA を抽出した。

##### 2) 逆転写反応

逆転写反応は Omniscript RT Kit を用い、Chart 1 に示した方法で行った。

Component	Volume/Reaction	Cycle
10× Buffer RT	2 μL	37°C 60 min
dNTP Mix (5 mM each dNTP)	2 μL	93°C 5 min
Random Primer (50 ng/μL)	2 μL	↓ cDNA
RNase inhibitor (10 unit/μL)	1 μL	
Reverse Transcriptase	1 μL	
RNase-Free Water	variable	
Template RNA	variable	
Total volume	20 μL	

Chart 1 Procedure of reverse transcription

### 3) PCR 反応

PCR 反応は HotStarTaq PCR を用い、Chart 2 に示した方法で行った。Primer は、Table VII に示したものをを用いた。

Component	Volume/Reaction	Cycle
10× PCR Buffer	10 μL	95°C 15 min
dNTP Mix (10 mM each)	2 μL	↓
Primer Mix (50 ng/μL)	1 μL	94°C 30 sec 51-53°C 1 min 72°C 1 min } ×40-45 cycles
HotStarTaq DNA polymerase	0.5 μL	
RNase-Free Water	variable	
Template DNA	variable	
Total volume	100 μL	↓ PCR product

Chart 2 Procedure for PCR

TableVII Sequences of primers for PCR

Name	HGNC name	Accession No.	Sequences
hMCT4	SLC16A3	NM_004207	Forward: 5'- atc ctg ggc ttc att gac at -3' Reverse: 5'- atg gag aag ctg aag agg ta -3'
hGAPDH	-	NM_002046	Forward: 5'- aag gtc atc cct gag ctg aa -3' Reverse: 5'- ttc tag acg gca ggt cag gt -3'

#### 4) 電気泳動

PCR 産物は 1%アガロースゲル(エチジウムブロマイド 10  $\mu$ g/100 mL を含む) にアプライし、100V、30 分間電気泳動を行った。泳動したゲルから ATTO Printgraph および ATTO ImageSaver AE-6905C を用いてバンドの蛍光を記録した。

#### viii) MCT4 強制発現細胞の構築

##### 1) プラスミドの構築

Caco-2 細胞より抽出した total RNA を鋳型とし、RT-PCR を行い、MCT4 および CD147 の全長 cDNA を得た。この cDNA を pGEM® T-easy ベクターに組み込み、pGEM-MCT4 および pGEM-CD147 を得た。pGEM-MCT4、pGEM-CD147 はそれぞれ Xho I および Sal I、EcoR I および Xho I により消化し、同じ酵素処理を行った pCI-neo、pcDNA3.1/zeo(+)にそれぞれ組み込んだ。これにより pCI-MCT4 および pcDNA-CD147 を得た。MCT4 には有効な抗体が無かったため、強制発現させた MCT4 の免疫組織化学的検出を可能にするために、MCT4 ORF の 5' 末端に FLAG エピトープ、3' 末端に c-myc、His エピトープをそれぞれ融合することにした。pCI-MCT4 を鋳型とし、PCR を行った。得られた cDNA を EcoR I

および Xho I により消化し、同じ酵素処理を行った pSF-1 に組み込んだ。DNA シークエンスにより塩基配列を確認し、pSF-FLAG-MCT4 を得た。pSF-FLAG-MCT4 および pcDNA-CD147 は大腸菌にトランスフォームし、単一のクローンを大量調製した。

## 2) 細胞への導入

まず LLC-PK1 細胞へ pcDNA-CD147 および pcDNA3.1/zeo(+)を導入したが、この際 blasticidin S 耐性マーカーを有する pSV2 を pcDNA3.1/zeo(+)の 10 分の 1 量 (w/w)、同時にトランスフェクトした。2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の blasticidin S によりセクションを行い、CD147 を安定発現した細胞株である LLC-CD147 細胞およびネガティブコントロールである LLC-pcDNA 細胞を得た。次に LLC-CD147 細胞および LLC-pcDNA 細胞に pSF-FLAG-MCT4 および pSF-1 をそれぞれ導入した。800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の G418 sulfate でセクションを行い、CD147 および MCT4-FLAG を共発現した細胞株である LLC-CD147/MCT4-FLAG 細胞および 3 種のネガティブコントロール細胞である LLC-pcDNA/pSF-1 細胞、LLC-CD147/pSF-1 細胞ならびに LLC-pcDNA/MCT4-FLAG 細胞を得た。

## ix) Western blotting 法

タンパク質抽出液を 4 倍量(v/v)の 9 M Urea 溶液および 5 倍量(v/v)の 2 $\times$ SDS sample buffer(0.1 M Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 10% 2-ME, 20% glycerol, 0.004% BPB)と混合し、100 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間加熱変性した後、SDS-PAGE による分離を行った。続いて、ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースメンブレン(BIO-RAD)へのタンパク質の転写を行った。転写は transfer buffer(48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% MeOH, 1.3 mM SDS)に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲルおよびニトロ



セルロースメンブレンをはさみ、15 V の電圧を 90 分間かけて行った。転写後、メンブレンを blocking buffer(0.05% Tween 20, 10% スキムミルク in PBS)中で 1 時間振盪した。20 倍希釈した blocking buffer で抗体価に応じて希釈した抗体液 1 mL とメンブレンを密封し、室温で 1 時間以上反応させた。その後メンブレンを wash buffer(0.05% Tween 20 in PBS)で 3 回洗浄した。20 倍希釈した blocking buffer で 4000 倍希釈した HRP 標識二次抗体 1 mL とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後メンブレンを wash buffer で 3 回洗浄し、ECLTM Western blotting detection reagent を 1 分間反応させ、X 線フィルムに露光した。

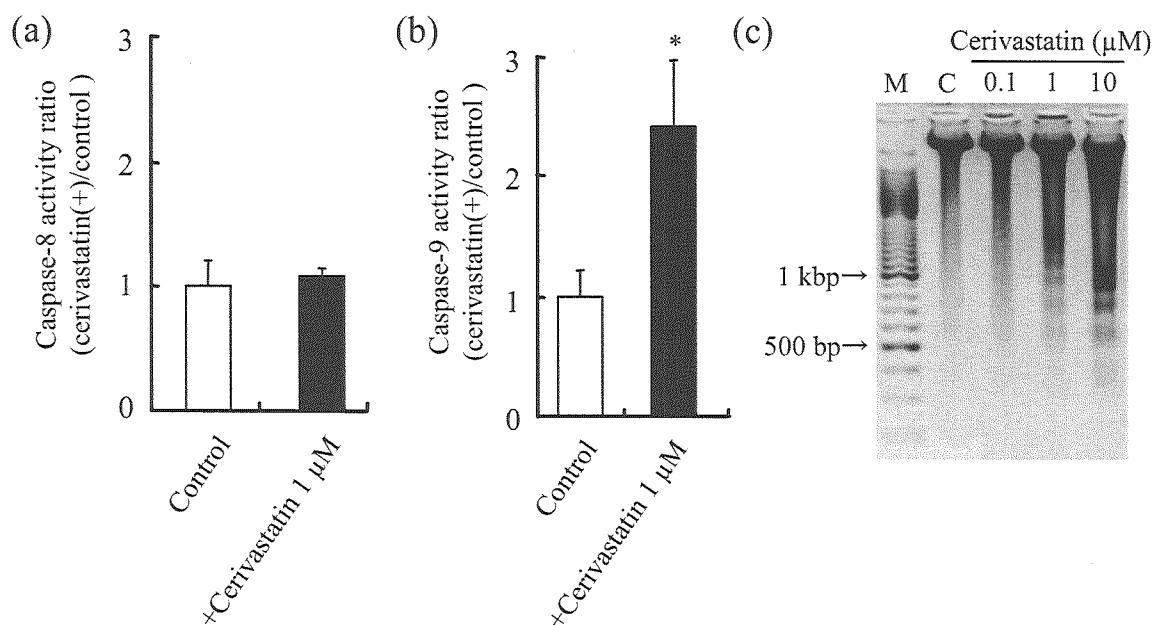
#### x) 乳酸取り込み実験法

細胞を 24well プレート(Coster)に 0.5 mL/well ずつ播種した。37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3-4 日間培養後、コンフルエントに達した細胞から培養液を吸引除去し、37°C の transport medium (Table II) 0.5 mL で 2 回洗浄した後、transport medium を 0.5 mL ずつ加え 37°C で 10 分間プレインキュベーションした。Transport medium を除去し、L- [<sup>14</sup>C] Lactic acid sodium salt(0.2 μCi)を transport medium に溶解して薬液とし、0.5 mL 添加して一定時間振盪しながらインキュベートした。薬液除去後、氷冷した transport medium 0.5 mL にて洗浄を行った。その後各 well に 0.2N NaOH-1% SDS 0.5 mL を加え細胞を溶解し、全量をバイアルに移し液体シンチレーター (ASC II、Amersham)を 5 mL 加え、放射活性を測定した。

### 第三節 実験結果

#### 第一項 スタチン系薬物誘導性アポトーシスにおけるカスパーゼ経路の同定

前述したとおり、アポトーシス経路には2つの主要な経路が知られている。1つは、カスパーゼ-9の上昇を伴うミトコンドリアを経由する経路であり、他方はカスパーゼ-8の活性化を伴う受容体を介する経路であるが、いずれの経路も最終的にカスパーゼ-3/7の活性化を介してDNA断片化などの種々のアポトーシス特有の変化を引き起こす。そこでスタチン系薬物によるアポトーシスにどちらの経路が関与するかを明らかにするために薬物曝露後のカスパーゼ-8, -9活性測定ならびにDNA断片化を検出した。



**Fig. 6. Effect of cerivastatin on caspase-8 (a) and -9 (b) activity ratio and DNA fragmentation induced by cerivastatin (c) in RD cells**

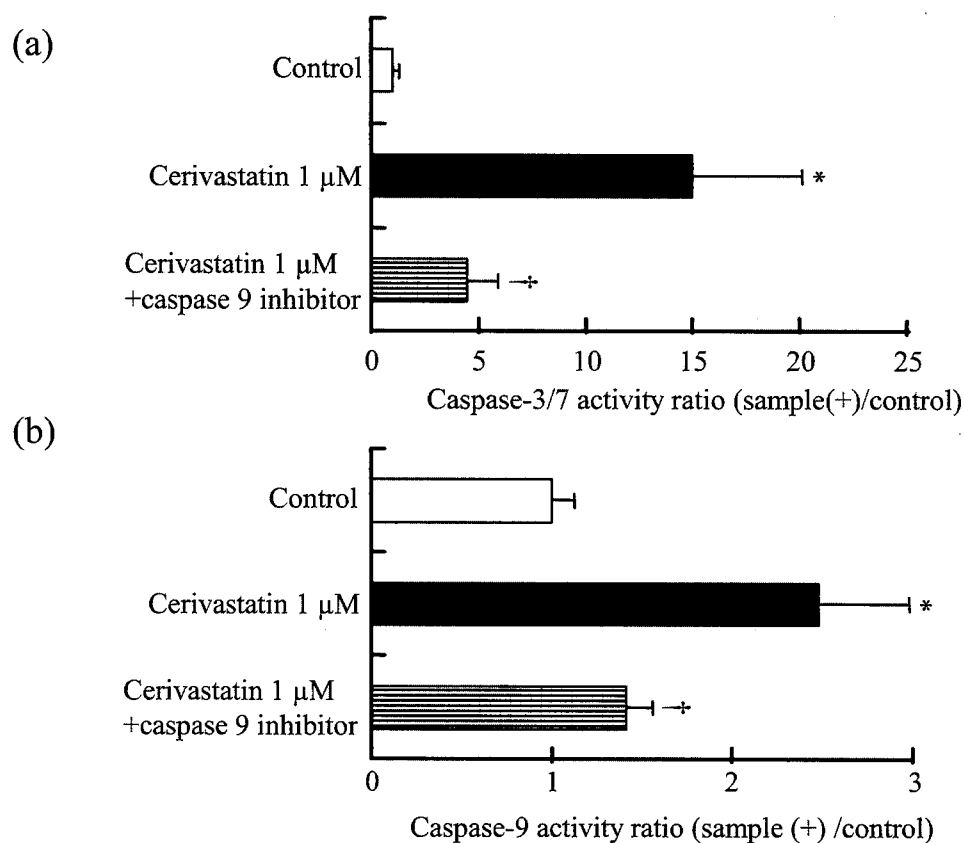
(a, b) Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ .

(c) Extracted DNA (20 μg) was electrophoresed on a 2% agarose gel.

M: marker, C: control

その結果、セリバスタチン曝露によりカスパーゼ-9 の活性化が認められ、さらにセリバスタチン濃度依存的な DNA の断片化が検出された(Fig. 6)。またカスパーゼ-8 の活性を測定したところ、活性化の程度は非常に弱いことが確認された(Fig. 6)。したがって、セリバスタチンによって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ-9 上昇を伴うことが示唆された。そこで次にカスパーゼ-9 上昇を伴うアポトーシスの経路を明確にするため、カスパーゼ-9 阻害剤の共存効果を検討した。



**Fig. 7. Effect of caspase-9 inhibitor on caspase-3/7 (a) and -9 (b) activity ratio in cerivastatin-treated RD cells**

RD cells were exposed to cerivastatin (1 μM) in the absence or presence of caspase-9 inhibitor (10 μM) for 48 hours. Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.01$ ,

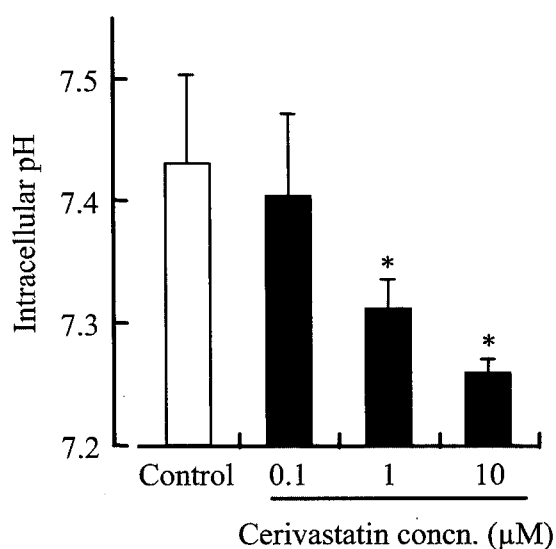
†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.05$ .

その結果、カスパーゼ-9 阻害剤の共存によりセリバスタチンが誘導するカスパーゼ-3/7 および-9 の活性化は有意に抑制されることが示された(Fig. 7)。

これらの結果より、スタチン系薬物による骨格筋細胞障害はミトコンドリアを介したアポトーシスに起因していることが示唆された。

## 第二項 スタチン系薬物誘導性アポトーシスと細胞内酸性化との関連性

ミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘因刺激の一つに細胞内の酸性化が知られている<sup>37-39)</sup>。そこでスタチン系薬物によるアポトーシスに細胞内酸性化が関与しているか否かを明らかにするためにスタチン系薬物曝露時の細胞内 pH 変動について検討を行った。



**Fig. 8.**  
**Effect of cerivastatin on intracellular pH in RD cells**

Intracellular acidification was measured with BCECF-AM at 48 hours.

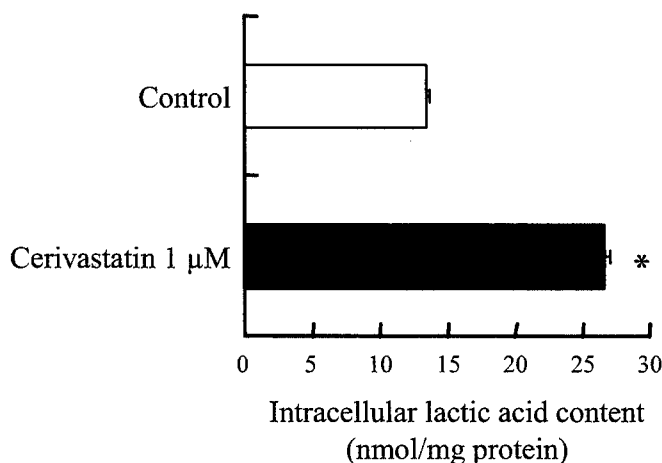
Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ .

その結果、セリバスタチン曝露時の骨格筋細胞内 pH は、薬物濃度依存的に低下することが明らかになった(Fig. 8)。すなわち、スタチン系薬物の細胞障害は細胞内酸性化の過程を経てアポトーシスを誘導することが示唆された。

次にこの細胞内酸性化がどのような機序で生じているのかを明らかにする

ため、骨格筋細胞で主に産生される乳酸に着目し、セリバスタチン処理 48 時間後の細胞内乳酸量を測定した。

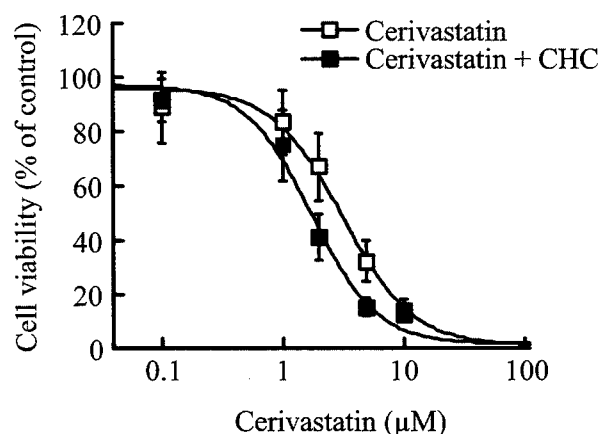


**Fig. 9. Effects of cerivastatin on intracellular lactic acid content of RD cells**

Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ .

その結果、セリバスタチン 1 μM 曝露によって、有意な細胞内乳酸量の上昇が認められた(Fig. 9)。酸性物質である乳酸は過剰な蓄積によってアポトーシスを引き起こすことが報告されている。このことからセリバスタチンは細胞内乳酸量を上昇させることにより細胞内酸性化を誘導し、アポトーシスを引き起こしていることが示唆された。そこで次にセリバスタチンと乳酸排出阻害剤である CHC を共存させた時の細胞生存率低下に及ぼす影響を検討した。



**Fig. 10.**

**Effect of CHC on reduction of RD cell viability treated by cerivastatin**

RD cells were exposed to various concentrations of cerivastatin in the absence or presence of 0.5 mM CHC for 48 hours.

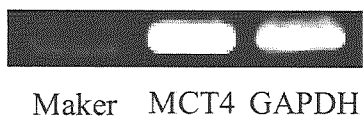
Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 6-12 determinations.

その結果、CHC 共存によりセリバスタチンによる生存率の低下効果は増強することが示された(Fig. 10)。これは CHC の併用によりスタチン系薬物が誘導する細胞内乳酸量の増大をさらに増強したことに起因していると考えられる。

### 第三項 筋細胞における MCT4 を介した乳酸輸送とスタチン系薬物の阻害効果

細胞内の乳酸量を調節することが知られている monocarboxylate transporter (MCT)に着目した。MCT は乳酸を基質とし、細胞内外の乳酸濃度を調節することによって細胞内 pH の恒常性に寄与している。そこで骨格筋細胞における MCT の発現ならびに機能解析を行った。まず RD 細胞における MCT アイソフォームの発現確認ならびに乳酸輸送実験を行った。

#### ・ RT-PCR



#### ・ Western blot

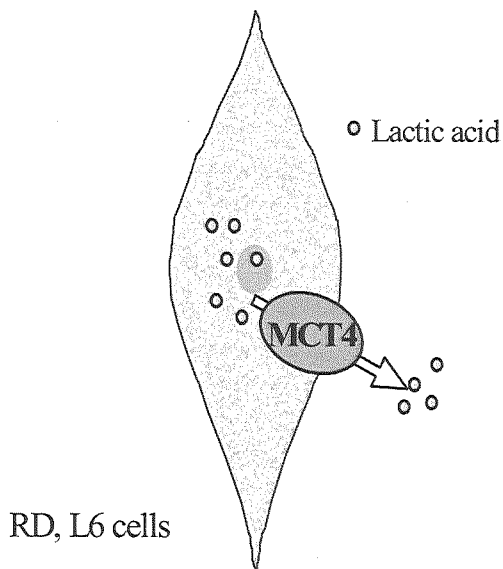
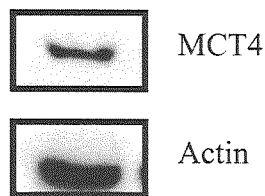


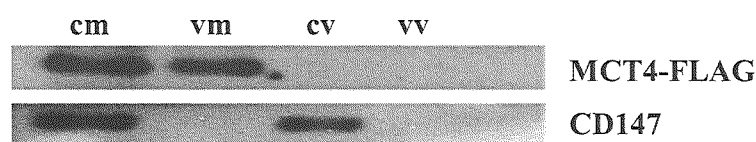
Fig. 11. Transport mechanism of L-lactic acid in RD and L6 skeletal muscle cells

RD 細胞において MCT4 mRNA および MCT4 蛋白の発現が認められた(Fig. 11)。また L6 細胞においても同様の結果を得た。さらに乳酸の排出実験により RD および L6 細胞からの乳酸排出には MCT4 が関与することが明らかとなった(データは示さない)<sup>41, 42)</sup>。

一方、スタチン系薬物の動態に着目すると、Tamai らは血液脳関門において MCT がスタチン系薬物を輸送することを報告している<sup>43)</sup>。また消化管吸収モデル細胞である Caco-2 細胞における atorvastatin 輸送および腎由来の NBL-1 細胞の lovastatin 輸送にそれぞれ MCT が関与していることが報告されている<sup>44-46)</sup>。

したがって、乳酸の排出方向に働く MCT4 に対してもスタチン系薬物は基質あるいは阻害薬として作用することが予想される。スタチン系薬物が乳酸排出を阻害するならばスタチン系薬物による細胞内乳酸量の上昇を説明できるのではないかと考えた。そこで MCT4/CD147 強制発現細胞を用いてスタチン系薬物の阻害効果について検討した。MCT4 強制発現細胞を作成するにあたり MCT4 の膜への局在を補助する蛋白質である CD147 を共発現させた。

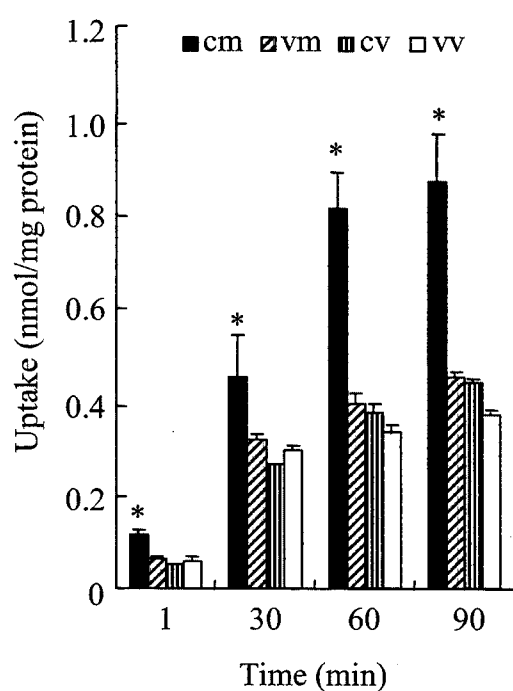
そこでまず MCT4 および CD147 トランスフェクション後の蛋白発現をウエスタンブロッティングによって確認した。



**Fig. 12. Expression of CD147 and MCT4-FLAG in cm, vm, cv and vv cells**

Proteins were separated by SDS-PAGE, and western blotting was performed with antibodies against CD147 and FLAG.

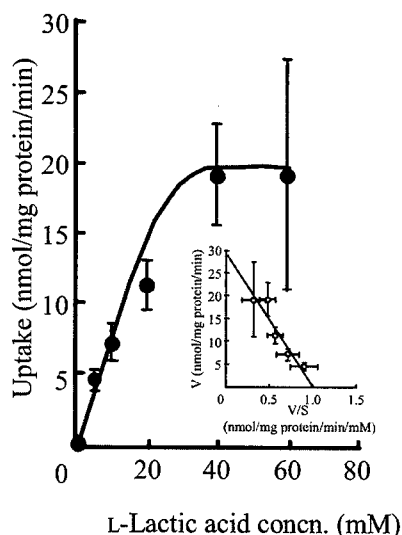
cm は、MCT4 および CD147 を共発現させたもの、vm は MCT4 のみ発現させたもの、cv は CD147 のみ発現させたもの、vv はベクターのみを発現させたものであり、いずれも導入した蛋白の発現のみが認められた(Fig. 12)<sup>47)</sup>。そこで次に導入した MCT4 が輸送活性を有しているか否かを確認するため、MCT4 の基質である乳酸を用いて取り込み実験を行った。



**Fig. 13.**  
**Uptake of L-lactic acid (3.3 μM)**  
**by cm, vm, cv and vv cells**  
 [<sup>14</sup>C] L-lactic acid uptake by cm, vm, cv and vv cells was measured at pH 6.0. Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.  
 \*: significantly different from vm, cv and vv cells at p < 0.05.

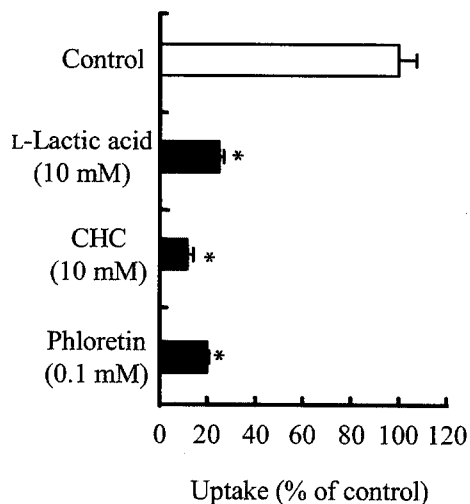
その結果、MCT4 のみ(vm)および CD147 のみ(cv)発現させたものはベクターのみ(vv)を発現させたものと同程度の取り込み値しか示さなかった。一方、MCT4 および CD147 を共発現させた場合(cm)には、取り込み活性の増強が認められた(Fig. 13)<sup>47)</sup>。そこで次に MCT4/CD147 共発現細胞(cm)が、MCT4 の輸送特性を有しているかを明らかにするため、乳酸取り込みの濃度依存性について検討を行った。





**Fig. 14.**  
**Concentration dependence of the uptake of L-lactic acid**

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 determinations.

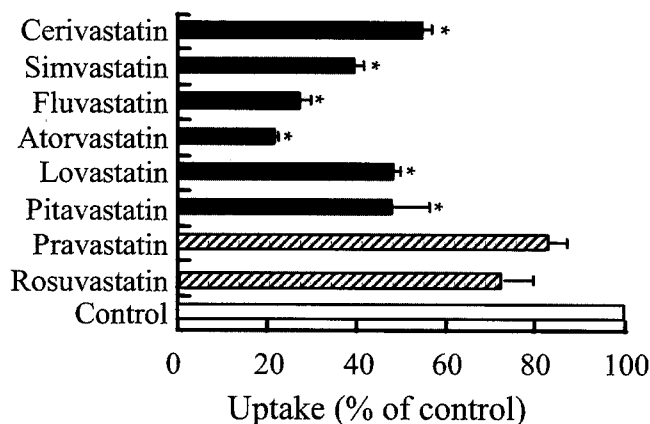


**Fig. 15.**  
**Inhibitory effects of substrate and inhibitors of MCT4 on L-lactic acid uptake**

Each column represents the mean with S.D. of 3-8 determinations.

\*; significantly different from control at  $p < 0.01$ .

MCT4/CD147 共発現細胞(cm)における乳酸取り込みは濃度依存性を示し、親和性の強さを示す  $K_m$  は 28.7 mM と算出された(Fig. 14)。この値は oocyte 発現系で報告されている MCT4 の  $K_m$  値 28.5 mM とほぼ一致した<sup>48)</sup>。さらに MCT4 の基質(L-Lactic acid)および阻害剤(Phloretin, CHC)によって MCT4 を介した乳酸輸送は強く阻害されることが示された(Fig. 15)。したがって、強制発現させた MCT4 は十分機能していると考え、スタチン系薬物の阻害効果の検討を行った。



**Fig. 16.**  
**Inhibitory effects of statins (100  $\mu$ M) on L-lactic acid uptake**

The [<sup>14</sup>C] L-lactic acid uptake by cm was measured at pH 6.0.

Each column represents the mean with S.D. of 3-6 determinations.

\*: significantly different from control at  $p < 0.01$ .

その結果、細胞毒性の大きいことが示唆された脂溶性スタチン類は MCT4 を介した乳酸輸送を強く阻害することが示された。一方、細胞毒性の低い水溶性スタチンによる阻害効果はほとんど認められなかった。細胞毒性と MCT4 に対する阻害効果には関連性があることが示唆された(Fig. 16)。

#### 第四節 考察

本章では第一章において最も障害性の高かったセリバスタチンを用いてスタチン系薬物による筋障害発生機序について詳細な検討を行った。セリバスタチンによる細胞障害にはカスパーゼ-9 の活性化を伴うアポトーシスが関与していることが示された。一方、カスパーゼ-8 の活性化は非常に弱いことが示された (Fig. 6)。これらの結果は、Zhong らの結果とよく一致するものであった<sup>49)</sup>。

さらにセリバスタチンによるカスパーゼ-3/7 および-9 の活性化はカスパーゼ-9 阻害剤によりコントロールレベルまで抑制されることが示された (Fig. 7)。このことからセリバスタチンによるアポトーシスはミトコンドリア経路を介することが明らかになった。ミトコンドリアを介したアポトーシス経路を誘導する一因に細胞内酸性化が報告されている<sup>37-39)</sup> ことから、次にセリバスタチン曝露後の細胞内 pH を測定した。その結果、セリバスタチン濃度依存的に細胞内酸性化が誘導されることが示された (Fig. 8)。

次にこの細胞内酸性化の発生機序を明らかにするため、骨格筋細胞で主に産生される乳酸に着目した。酸性物質である乳酸は、その過剰な蓄積によりアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>39)</sup>。そこでセリバスタチン曝露後の細胞内乳酸量を測定したところ、有意な細胞内乳酸量の上昇が認められた (Fig. 9)。このことからスタチン系薬物により細胞内乳酸量の上昇が誘導された結果、細胞内酸性化を伴うアポトーシスが引き起こされることが示唆された。

骨格筋細胞における乳酸の出入りには monocarboxylate transporter (MCT) が関与している。現在 MCT ファミリー (SLC16) は、1-14 のアイソフォームの存在が報告されている<sup>50)</sup>。このうち基質や機能についての報告があるのは、MCT1 (SLC16A1)、MCT2 (SLC16A7)、MCT3 (SLC16A8)、MCT4 (SLC16A3)、

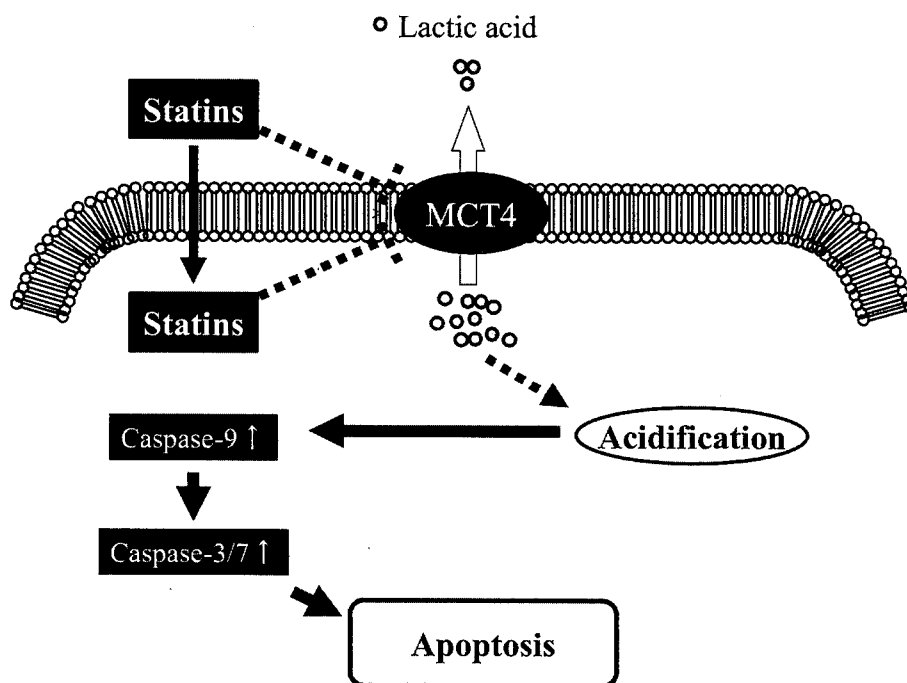
MCT6(SLC16A6)、MCT8(SLC16A2)ならびに TAT1(SLC16A10)である。MCT1-4 は乳酸やピルビン酸などの短鎖脂肪酸と  $H^+$  を共輸送する<sup>48, 51-54</sup>)。MCT6 は利尿薬であるブメタニドを基質とし<sup>55</sup>)、また MCT8 は、 $Na^+$  および  $H^+$  非依存的に甲状腺ホルモンであるチロキシンおよびトリヨードチロニンを輸送する<sup>56</sup>)。TAT1 は  $Na^+$  および  $H^+$  非依存的な芳香族アミノ酸トランスポーターである<sup>57</sup>)。そこでまず骨格筋由来細胞である RD および L6 細胞における乳酸輸送に関わる MCT アイソフォームを明らかにすることを試みた。これまでの報告から MCT1-4 が乳酸を基質とすることから MCT1-4 の発現解析ならびに機能解析を行った。その結果、RD および L6 細胞のいずれにおいても MCT4 が乳酸の排出に働くことが示された(データは示さない)<sup>41, 42</sup>)。Fishbein らは MCT4 が主に細胞内に蓄積した乳酸を排出する役割を果たすということを示唆しており<sup>58</sup>)、今回の結果と一致するものであった。次に細胞内乳酸量の上昇がスタチン系薬物の細胞障害に影響を与えるか否かを検討した。乳酸排出阻害剤である CHC 0.5 mM をセリバスタチンと併用した時、細胞生存率低下効果は、セリバスタチン単独のものと比較して増強した (Fig. 10)。すなわちセリバスタチンと CHC の併用により細胞内乳酸量が増加した結果、細胞障害性が増強することが示唆された。そこで次に MCT4/CD147 強制発現細胞を用いてスタチン系薬物の阻害効果について検討を行った。MCT4/CD147 共発現細胞への乳酸取り込みは濃度依存性を示し、 $K_m$  値は 28.7 mM と算出され、oocyte 発現系で報告されている MCT4 の  $K_m$  値 28.5 mM とほぼ一致した<sup>48</sup>)。さらに MCT4 の基質および阻害剤によって MCT4 を介した乳酸輸送は強く阻害された(Fig. 15)。この強制発現系を用いて検討した結果、細胞毒性の大きい脂溶性スタチン類は MCT4 を介した乳酸輸送を強く阻害することが示された(Fig. 16)。一方、細胞毒性の低い水溶性スタチンによる阻害効果はほとんど認められなかった。前述のとおり、スタチン類の細胞毒性は、脂溶

性の高いもので強いことから細胞毒性と MCT4 への阻害効果とは正の相関があることが示唆された。

以上の結果より、スタチン系薬物によって誘導される細胞内乳酸量の上昇は、筋細胞からの MCT4 を介した乳酸排出をスタチン系薬物が阻害することに起因していることが示唆された。しかしながら Takeda らは、フルバスタチンおよびシンバスタチンの有効血漿中濃度がそれぞれ 2.30  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$  と報告している<sup>59)</sup>。今回検討したスタチン系薬物の濃度は臨床での血漿中濃度域と比較して高濃度であることから、今後、MCT4 に対するスタチン系薬物の  $K_i$  値を算出し、 $\text{IC}_{50}$  値と比較することが必要である。さらに長時間のスタチン系薬物共存下の乳酸取り込み実験を行うなどして MCT4 の関与をさらに明確にする必要があると考えられる。

## 第五節 まとめ

スタチン系薬物によるアポトーシス発生機序について明らかにするため、本章ではスタチン系薬物の中で最も障害性の高いセリバスタチンを用いて種々の検討を行った。セリバスタチンは、細胞内乳酸量の上昇、細胞内酸性化ならびにカスパーゼ-9の活性化を引き起こし、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導した。またその細胞内乳酸量の上昇において筋細胞からのMCT4を介した乳酸排出をスタチン系薬物が阻害することがその一因となっている可能性が示された。



### 第三章 スタチン系薬物による筋障害発症リスク軽減方法

#### 第一節 緒言

前述のとおりスタチン系薬物による横紋筋融解症発症リスクを軽減させる方法について具体的に検討した報告は少ない。Nabaらは ethyl eicosapentanoate がスタチン系薬物の筋障害を抑制すると報告しているが、その抑制機序は明確になっていない<sup>60)</sup>。そこで本章ではスタチン系薬物による筋障害発症リスク軽減方法に関する検討を行った。スタチン系薬物服用中に横紋筋融解症が発症した場合、まずスタチン系薬物の投与が中止される。したがって、休薬期間は脂質コントロールができないことが想定される。そこでスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下効果を保持したまま副作用のみを軽減する方法の確立を試みた。第二章においてスタチン系薬物による筋細胞のアポトーシスには、乳酸蓄積と細胞内酸性化が関与することを明らかにした<sup>61)</sup>。それらの知見から細胞内乳酸量を減少させ、かつ細胞内をアルカリ化する物質を併用することでスタチン系薬物による筋障害を抑制できるのではないかと考えた。

実際の臨床現場で用いられているアルカリ化剤として炭酸水素ナトリウム(商品名:メイロン)およびクエン酸(商品名:ウラリット)が挙げられる<sup>62-64)</sup>。本章ではこれらの薬物とスタチン系薬物の併用時における抑制効果について細胞生存率、細胞形態変化ならびにカスパーゼ活性の点から検討した。またこのアルカリ化剤の効果が *in vivo* においても確認できるか否かを明らかにするため、セリバスタチンを用いて横紋筋融解症モデルラットの作成を試みた。*In vivo* における筋障害の評価としては、実際の臨床の場においても横紋筋融解症の指標とされている血中クレアチンホスホキナーゼ(CPK)活性測定およびミオグロビ

ン尿の観察によって行った。本章ではこのモデルを用いて炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸の抑制効果について検討したので以下に詳述する。



## 第二節 実験材料および実験方法

### i) 使用薬物・試薬

第一章 第二節 i)および第二章 第二節 i)で述べたものについては記載を省略した。

Cholesterol assay kit	Cayman Chemical
CPK II-テストワコー	Wako
Sodium bicarbonate	Wako
Trisodium citrate	Wako

### ii) 細胞培養法

第一章 第二節 ii)で述べた。

### iii) MTT assay 法

第一章 第二節 iii)で述べた。

### iv) 細胞内 pH 測定法

第二章 第二節 v)で述べた。

### v) カスパーゼ活性測定法

第一章 第二節 iv) で述べた。

vi) 細胞内コレステロール量測定法

細胞を 12well プレート(Coster)に 1 mL/well ずつ播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液に溶解させた薬物を 1 mL 添加し、一定時間培養を行った。その後、セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離(2,900×g, 5 min) により細胞を回収した。回収した細胞を PBS (4 °C) 1 mL で 2 回洗浄し、コレステロールを抽出するために hexane : isopropanol (3 : 2 v/v) 混合液 1.5 mL を加え、激しく混和した。30 分間静置後 37°C で蒸発乾固し、hexane 300 μL に再び溶解した。Cholesterol assay kit を用いて cholesterol assay cocktail を調製し、96well プレート (FALCON) 上でサンプル 25 μL と cholesterol assay cocktail 25 μL を合わせ 250 rpm で 30 秒振盪させた後、37°C で 30 分間反応させた。その後、励起波長 544 nm、蛍光波長 590 nm で測定した。

vii) 血漿中 CPK 測定法

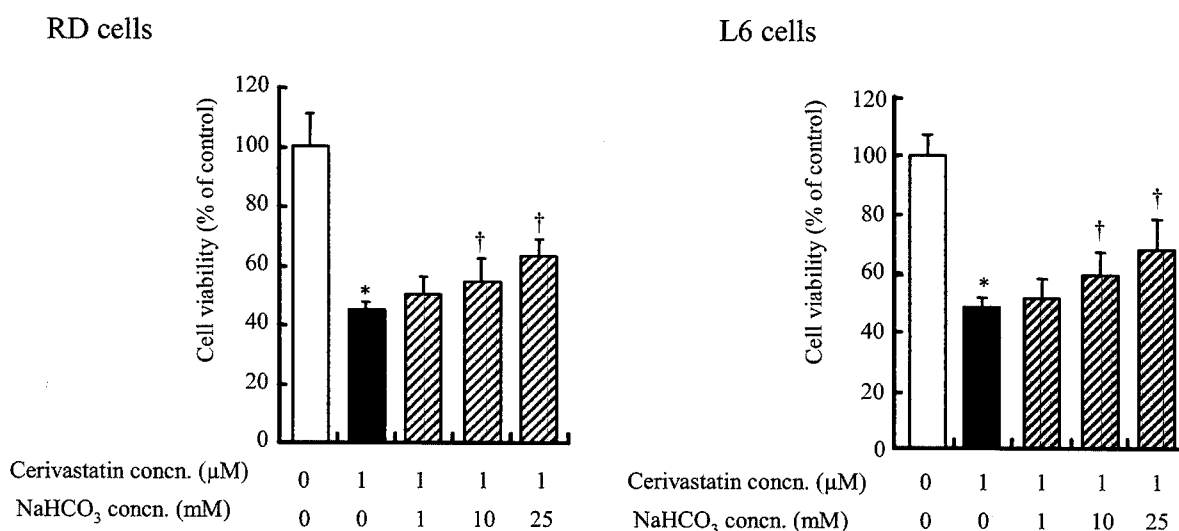
ラットをエーテルで予め処置後、ペントバルビタール (40-50 mg/kg; i.p.) にて麻酔した。ラットを解剖台に固定し、大腿部を切開して大腿静脈を露出し、生理食塩水に溶解した薬液を投与した。その後、経時的に大腿静脈より血液を 0.3 mL ずつ採取し、直ちに微量のヘパリンを添加した。その後、遠心分離 (1,600 ×g, 10 min) を行い、上清を得て血漿サンプルとした。

血漿サンプル中の CPK の定量は、クレアチンホスホキナーゼ測定用 CPK II-テストワコー(Wako)のプロトコールに準拠した。

### 第三節 実験結果

#### 第一項 スタチン系薬物による筋細胞アポトーシスに対する炭酸水素ナトリウムの影響

アルカリ化剤である炭酸水素ナトリウムをセリバスタチンと併用した時のRD および L6 細胞生存率に与える影響を検討した。



**Fig. 17. Effect of sodium bicarbonate on reduction of RD and L6 cell viability**

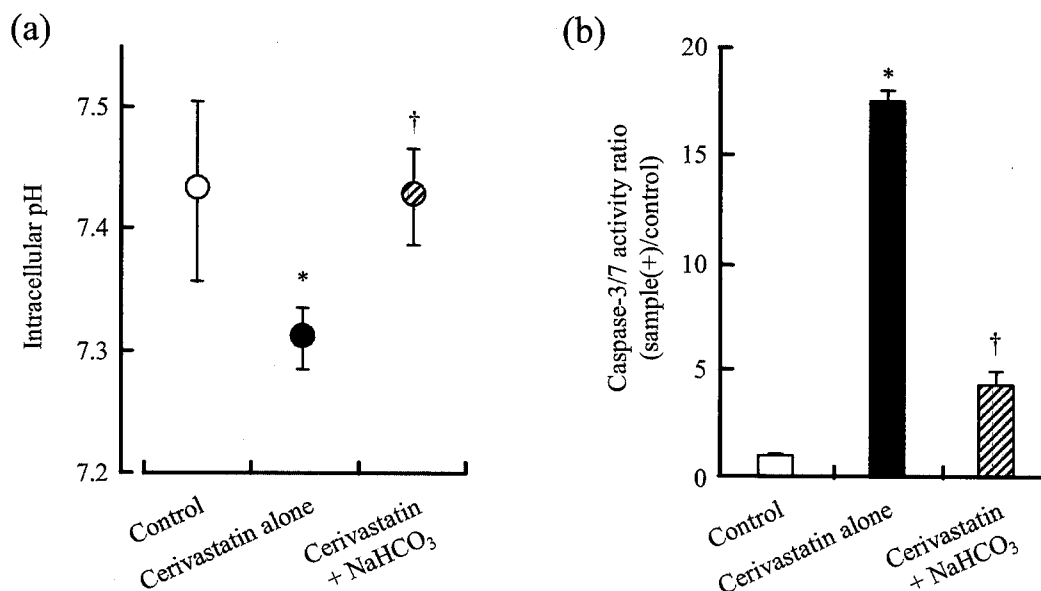
Each column represents the mean with S.D. of 4-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.01$ ,

†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.01$ .

炭酸水素ナトリウムはRD および L6 細胞においてセリバスタチンによる細胞生存率低下を 1-25 mM の範囲で濃度依存的に抑制した(Fig. 17)。したがって、以降の検討は最も効果の高かった炭酸水素ナトリウム 25 mM 併用を選択することとした。

次に、セリバスタチンが誘導する細胞内酸性化およびアポトーシスに対するこの炭酸水素ナトリウム併用による効果を検討した。



**Fig. 18. Effect of sodium bicarbonate on acidification (a) and caspase-3/7 activity ratio (b) in cerivastatin-treated RD cells**

RD cells were exposed to cerivastatin (1  $\mu$ M) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4).

(a) Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3-6 determinations.

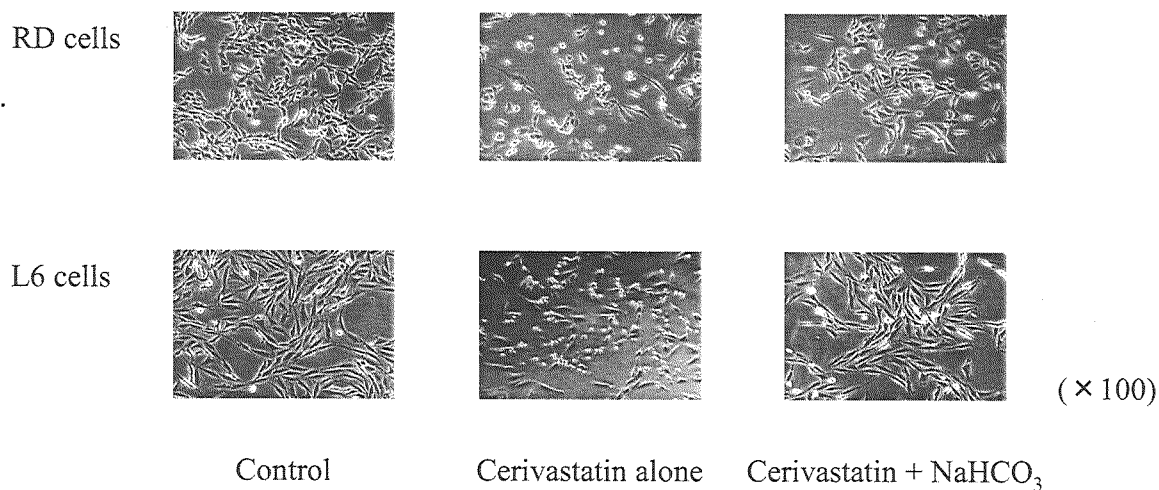
(b) Each column represents the mean with S.D. of 3 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ ,

†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.05$ .

その結果、炭酸水素ナトリウム 25 mM を併用することによってセリバスタチンによる細胞内酸性化は抑制されることが示された。またセリバスタチン添加によるカスパーゼ-3/7 活性の上昇は、炭酸水素ナトリウム併用によって有意に抑制されることが示された(Fig. 18)。このことから、セリバスタチンによって誘導

されるアポトーシスに対し、炭酸水素ナトリウムが抑制的に作用している可能性が示唆された。次に同様の条件でセリバスタチンが誘導する RD および L6 細胞の球状化に対する炭酸水素ナトリウムの効果について検討した。

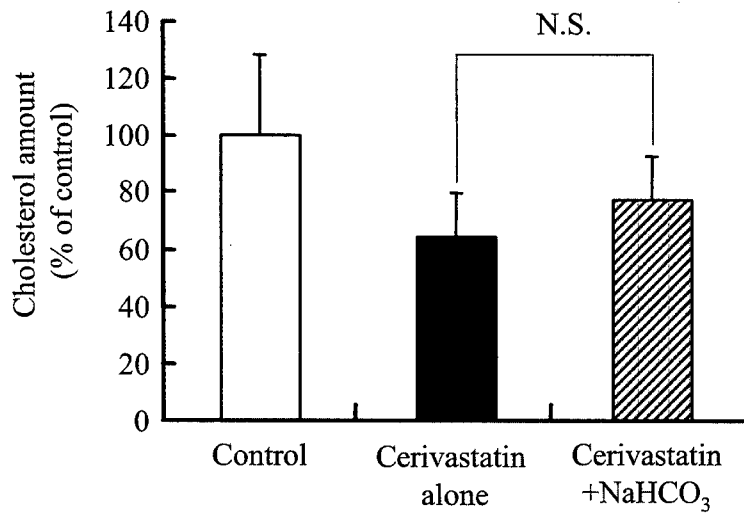


**Fig. 19. Effect of sodium bicarbonate on morphological degeneration in cerivastatin-treated RD and L6 cells**

RD cells were exposed to cerivastatin (1  $\mu$ M) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4).

その結果、セリバスタチンによる RD および L6 細胞の球状化についても炭酸水素ナトリウムによって抑制されることが明らかになった(Fig. 19)。

次にこの炭酸水素ナトリウムによる筋障害抑制効果がスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下に与える影響を検討した。



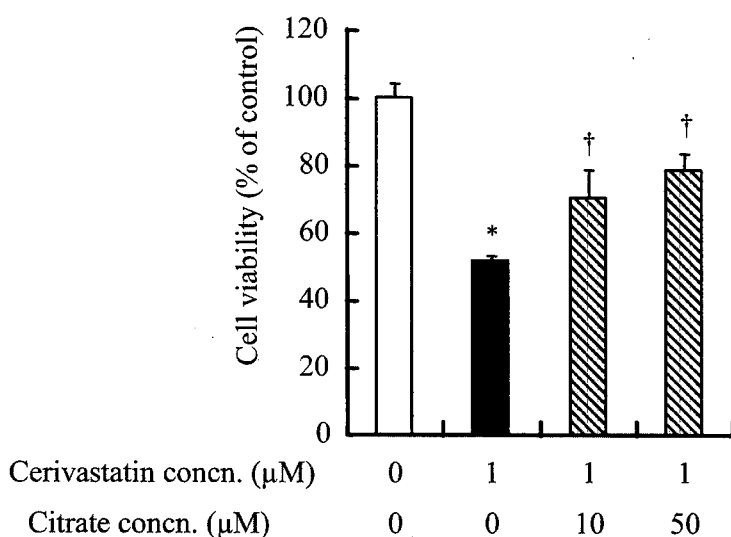
**Fig. 20. Effect of sodium bicarbonate on cholesterol-lowering effect**

Cells were exposed to cerivastatin (1  $\mu$ M) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4). Each column represents the mean with S.D. of 3 determinations.

その結果、セリバスタチンによるコレステロール低下に対して炭酸水素ナトリウムは、影響を与えないことが明らかとなった(Fig. 20)。したがって、アルカリ化剤はスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下作用にはまったく影響を与えず、副作用である筋障害のリスクのみを大幅に軽減できることが示唆された。次にアルカリ化による軽減効果をさらに明確にするために炭酸水素ナトリウムと同様に臨床現場でアルカリ化剤として汎用されるクエン酸を用いて検討を行った。まずセリバスタチンが誘導する RD 細胞生存率低下に対するクエン酸の影響を明らかにすることを試みた。

## 第二項 スタチン系薬物による筋細胞アポトーシスに対するクエン酸の影響

アルカリ化剤であるクエン酸を併用した時の RD 細胞生存率に与える効果を検討した。



**Fig. 21. Effect of citrate on reduction of RD cell viability**

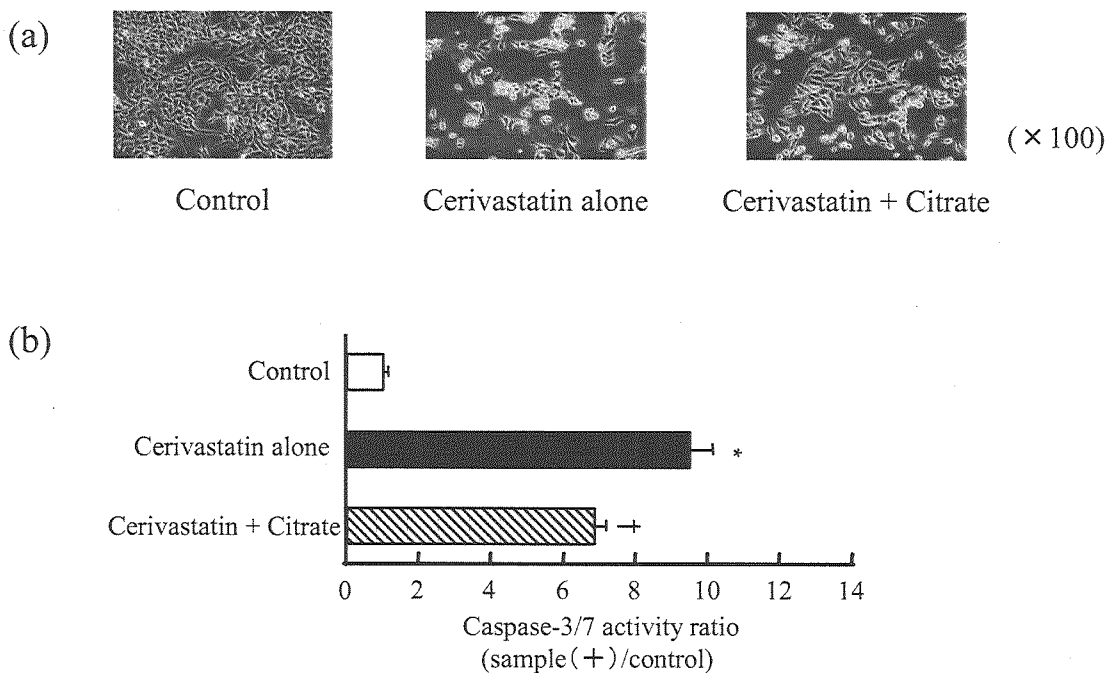
Each column represents the mean with S.D. of 4-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ ,

†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.05$ .

その結果、セリバスタチンのみ添加と比較して、クエン酸 10、50 μM を同時添加した時には細胞生存率の有意な上昇が認められた(Fig. 21)。したがって、クエン酸も炭酸水素ナトリウムと同様にセリバスタチンによる細胞生存率低下に対して抑制効果を示すことが示唆された。

次にセリバスタチン接触によるアポトーシスに対し、クエン酸の同時添加の効果を形態変化観察およびカスパーゼ-3/7 活性を測定することにより評価した。



**Fig. 22. Effect of citrate on morphological degeneration (a) and caspase-3/7 activity ratio (b) in cerivastatin-treated RD cells**

RD cells were exposed to cerivastatin (1  $\mu$ M) in the absence or presence of 50  $\mu$ M citrate (pH 7.4) for 48 hours.

Each column represents the mean with S.D. of 4-6 determinations.

\*; significantly different from control (no addition) at  $p < 0.05$ ,

†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.05$ .

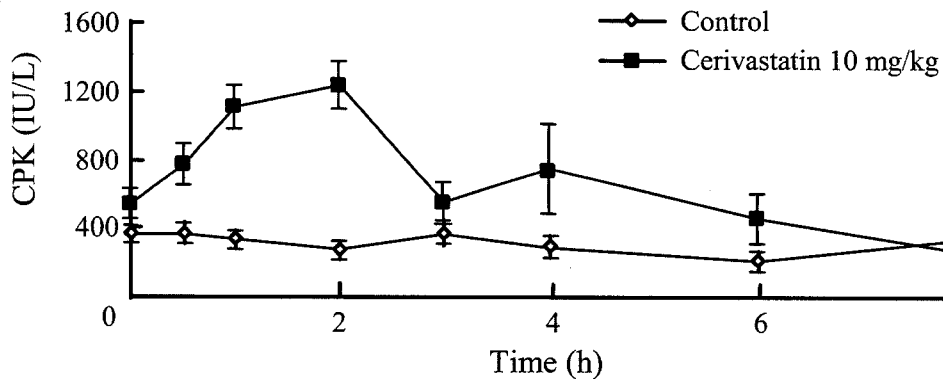
その結果、セリバスタチンのみ添加と比較して、クエン酸同時添加においては球状化の割合の減少が確認できた(Fig. 22(a))。この結果は Fig. 21 の生存率低下に対するクエン酸の効果とよく対応していた。さらにカスパーゼ-3/7 活性に関してもクエン酸同時添加により有意な抑制効果が認められた(Fig. 22(b))。したがって、炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸などのアルカリ化剤がスタチン系薬物によるアポトーシスに対し、抑制的に働くことが明らかになった。



### 第三項 横紋筋融解症モデルラットに及ぼすアルカリ化剤の影響

*In vitro* 系で明らかにした炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸の細胞障害抑制効果が *in vivo*、すなわち個体レベルでも有効であるかは、薬物治療の最適化を図るうえで極めて重要であると考えられる。そこでセリバスタチン単回投与による横紋筋融解症モデルラットを作成し、炭酸水素ナトリウム投与による保護効果を検証した。スタチン系薬物により筋障害が発症した際、筋細胞中の CPK が血液中に流出することから血漿中 CPK 値は筋障害の指標となる。

そこで、セリバスタチン溶液をラット下大腿静脈から静脈内投与し、血漿中 CPK 値を測定することによって筋障害の程度を評価した。

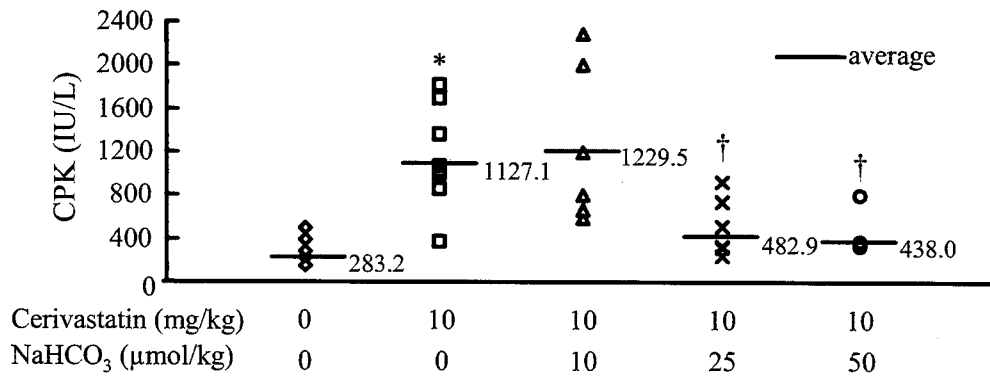


**Fig. 23. Plasma CPK levels after *i.v.* injection of cerivastatin**

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-7 determinations.

その結果、投与後 2 時間まではセリバスタチン 10 mg/kg 投与群の血漿中 CPK 値は時間依存的に上昇することが示された(Fig. 23)。またその後は緩やかに減少し、投与後 8 時間においてはコントロールレベルまで低下した。またセリバスタチン投与により横紋筋融解症の臨床症状である褐色尿も確認することができ

た。このことからセリバスタチンにより筋障害が引き起こされていることが明確である。そこで次にこの *in vivo* モデルに及ぼす炭酸水素ナトリウムの効果を検証した。



**Fig. 24. Effect of sodium bicarbonate on plasma CPK levels elevated by cerivastatin for 2 hours after *i.v.* injection**

Each point represents the mean of 4-8 determinations.

\*; significantly different from control at  $p < 0.01$ ,

†; significantly different from cerivastatin alone at  $p < 0.05$ .

その結果、セリバスタチンと炭酸水素ナトリウムを同時に投与することにより、セリバスタチンによる CPK 上昇は 10-50  $\mu\text{mol/kg}$  の範囲で濃度依存的に抑制されることが明らかとなった(Fig. 24)。またクエン酸においても 12.5-25  $\mu\text{mol/kg}$  の範囲で同様の効果が認められた(データは示さない)。

#### 第四節 考察

本章ではスタチン系薬物の筋障害性を抑制する物質の探索を目的に種々検討を行った。第二章においてスタチン系薬物によって誘導されるアポトーシスには細胞内酸性化が関与することを明らかにした。そこで、細胞内をアルカリ化する物質を併用することでスタチン系薬物による筋障害を抑制できるのではないかと考えた。アルカリ化する物質としては、臨床においてもアルカリ化剤として汎用される炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸を用いた。

炭酸水素ナトリウムは、セリバスタチンによる RD ならびに L6 細胞の生存率低下を濃度依存的に抑制した(Fig. 17)。さらに炭酸水素ナトリウムは、セリバスタチンによる細胞内酸性化およびカスパーゼ-3/7 の活性化に対しても抑制的に働くことが明らかとなった(Fig. 18)。また炭酸水素ナトリウムはセリバスタチンによる細胞の球状化に対しても抑制効果を示した(Fig. 19)。細胞の球状化はアポトーシスの特徴であり、かつアポトーシス経路のシグナルともなる<sup>65, 66)</sup>。したがって、炭酸水素ナトリウムはセリバスタチンによるアポトーシスに対し抑制的に働くことが示された。一方、この障害抑制効果が主作用であるコレステロール低下に対して影響を与える否かを検討した。その結果、セリバスタチンによるコレステロール低下に対して炭酸水素ナトリウムは、影響を与えないことが明らかとなった(Fig. 20)。したがって、アルカリ化剤はスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下作用にはまったく影響を与えず、副作用である筋障害のリスクのみを大幅に軽減できることが示唆された。次にアルカリ化による軽減効果をさらに明確にするため、炭酸水素ナトリウムと同様に臨床現場でアルカリ化剤として汎用されるクエン酸を用いて検討を行った。まずセリバスタチンが誘導する RD 細胞生存率低下に対するクエン酸の効果を明らかにする

ことを試みた。その結果、セリバスタチンのみ添加と比較して、クエン酸同時添加では細胞生存率の低下、細胞の球状化ならびにカスパーゼ-3/7 活性化において抑制効果が認められた(Figs. 21-22)。したがって、クエン酸においてもスタチン系薬物が誘導するアポトーシスに対して抑制効果を示すことが明らかとなった。また炭酸水素ナトリウムとクエン酸の障害抑制効果を比較すると、炭酸水素ナトリウムはセリバスタチンによるカスパーゼ活性上昇をコントロールレベルにまで低下させたのに対し、クエン酸の抑制効果は弱いものであった。

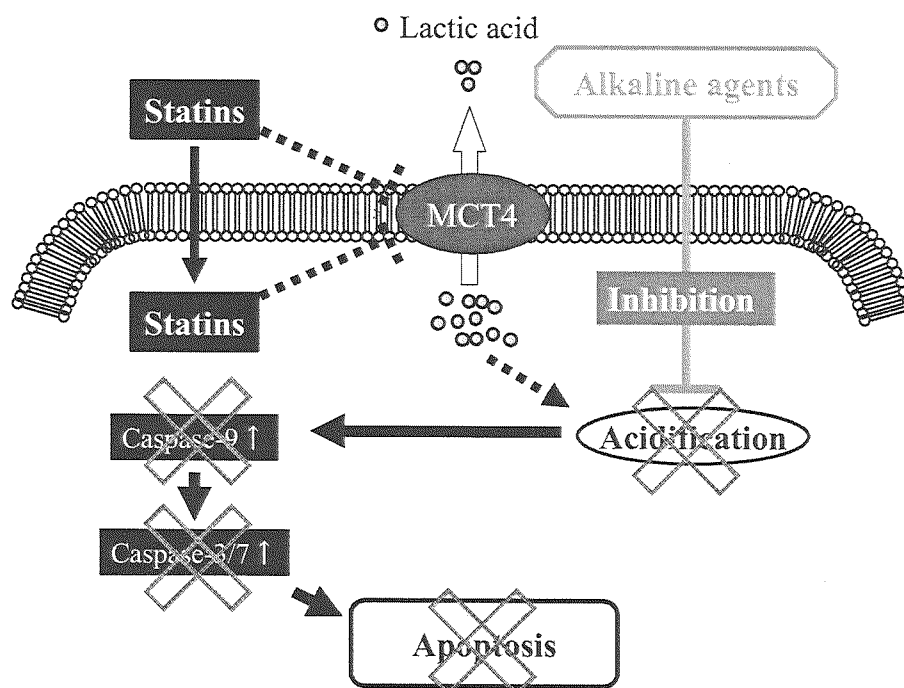
これまでスタチン系薬物が誘導する横紋筋融解症モデルラットの作成は困難であった<sup>67-69</sup>。そこで今回セリバスタチン単回投与による急性の横紋筋融解症モデルラットを作成し、炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸投与による保護効果を検証した。その結果、セリバスタチン 10 mg/kg 投与群の血漿中 CPK 値は投与後 2 時間までは時間依存的に上昇することが示された(Fig. 23)。その後は緩やかに減少し、投与後 8 時間においてはコントロールレベルまで低下した。この要因としては CPK が血中において分解されていると考えられるが、詳細は不明である。またセリバスタチン投与により横紋筋融解症の臨床症状である褐色尿も確認することができた。このことからセリバスタチンにより筋障害が引き起こされていることが示された。そこで次にこの *in vivo* モデルを用いて炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸の効果を検証した。その結果、セリバスタチンと炭酸水素ナトリウムを同時に投与することにより、セリバスタチンによる CPK 上昇は 10-50  $\mu\text{mol/kg}$  の範囲で濃度依存的に抑制されることが示された(Fig. 24)。またクエン酸においても 12.5-25  $\mu\text{mol/kg}$  の範囲で同様の効果が認められた(データは示さない)。したがって、これらのアルカリ化剤は、*in vivo* においてもスタチン系薬物による筋障害を抑制することを見出した。これまで *in vivo* における筋障害はネクローシスの関与が示唆されてきた<sup>70-71</sup>。本検討より *in vitro* におい

て炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸がスタチン系薬物によるアポトーシスに対して抑制効果を示し、さらに *in vivo* においてもその効果を発揮した。今後 *in vivo* においても骨格筋におけるアポトーシス関連遺伝子の発現量を測定し、それらの関与を明確にすることは極めて重要である。

スタチン系薬物の投与によりアシドーシスを発症した報告もあることから<sup>72)</sup>、炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸の併用はそれらの病態を防ぐことにも有用であると考えられる。一方、これらの薬物投与時によるアルカリ化に伴い、イオンバランスの変化による腎臓への負荷が起こる可能性がある。したがって、これら薬物の投与方法および腎臓に与える影響を今後 *in vivo* レベルで検討する必要があると考えられる。

## 第五節 まとめ

本章ではスタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法の確立を試みた。臨床現場で用いられているアルカリ化剤である炭酸水素ナトリウムあるいはクエン酸をスタチン系薬物と併用することにより、*in vitro* および *in vivo* におけるスタチン系薬物の筋障害は抑制されることが示唆された。またアルカリ化剤を併用してもコレステロール低下率に全く影響を与えないことも明らかとなった。本検討により、スタチン系薬物の主作用に対しては影響を与えず副作用のみを軽減する方法を確立したことから、スタチン系薬物の安全使用に関する重要な知見となることが期待される。



## 総括

スタチン系薬物の重篤な副作用に横紋筋融解症があり、現在まで発症機序を解明すべく種々検討が行われている。しかしながら発症機序は不明な点も多く、スタチン系薬物間での筋障害程度を比較した報告も少ない。また横紋筋融解症の発症リスク軽減方法に関する報告は、ほとんどないのが現状である。

そこで本研究ではこれまで市販されているすべてのスタチン系薬物が骨格筋由来細胞であるRD(ヒト由来)およびL6(ラット由来)に与える影響を明らかにし、薬物間の筋細胞障害性を比較することでスタチン系薬物による筋障害発症機序の解明を試みた。またこれらの知見をもとに *in vitro* および *in vivo* においてスタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法を評価した。

第一章では、すべてのスタチン系薬物を用いて筋細胞に与える影響を検討し、スタチン系薬物間での比較を行った。スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性には、細胞の縮小化ならびにカスパーゼ-3/7 の活性化を伴うアポトーシスが関与することを見出した。またスタチン系薬物のアポトーシスは薬物の分配係数と高い相関性を示し、脂溶性の高い薬物ほど障害性が強いことを見出した。さらにその障害性は、薬物の筋細胞内蓄積量に依存していることを示した。一方でスタチン系薬物のコレステロール低下率は脂溶性および筋障害性に相関しないことが示された。スタチン系薬物の適正使用の観点から、作用・副作用の両面を考慮する上で本検討が有用な知見になりうることが示唆された。

第二章では、スタチン系薬物の中で最も障害性の高いセリバスタチンを用いてアポトーシス機序の解明を目的に検討を行った。セリバスタチンは、細胞内乳酸量の上昇、細胞内酸性化ならびにカスパーゼ-9 の活性化を引き起こし、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することを示した。またその細

胞内乳酸量の上昇は、筋細胞からの MCT4 を介した乳酸排出をスタチン系薬物が阻害することに起因することを示唆した。本検討がスタチン系薬物の筋障害発症機序解明において有用な知見になりうることが考えられた。

第三章では、スタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法の確立を試みた。第二章においてスタチン系薬物による筋細胞障害に細胞内酸性化が関与することから細胞内 pH を適正值に維持することによってスタチン系薬物の細胞障害が軽減できるのではないかと考えた。*In vitro* および *in vivo* の検討から臨床現場で用いられているアルカリ化剤である炭酸水素ナトリウムおよびクエン酸を併用することによりスタチン系薬物の筋障害は抑制されることを示唆した。またアルカリ化剤を併用してもコレステロール低下率に影響を与えないことを明らかにした。本検討により、スタチン系薬物の主作用に影響を与えず、副作用のみを軽減する方法を確立したことからスタチン系薬物の安全使用の一助となることが考えられた。



## 參考論文

- 1) Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., Gotto, A.M. Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.*, 279: 1615–1622 (1998).
- 2) Havel, R.J., Rapaport, E. Management of primary hyperlipidemia. *New Engl. J. Med.*, 332: 1491–1498 (1995).
- 3) Jukema, J.W., Bruschke, A.V., van Boven, A.J., Reiber, J.H., Bal, E.T., Zwinderman, A.H., Jansen, H., Boerma, G.J., van Rappard, F.M., Lie, K.I., et al. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation*, 91: 2528–2540 (1995).
- 4) Weise, W.J., Possidente, C.J. Fatal rhabdomyolysis associated with simvastatin in a renal transplant patient. *Am. J. Med.*, 108: 351-352 (2000).
- 5) Alexandridis, G., Pappas, G.A., Elisaf, M.S. Rhabdomyolysis due to combination therapy with cerivastatin and gemfibrozil. *Am. J. Med.*, 109: 261-262 (2000).

- 6) Kubota, T., Fujisaki, K., Itoh, Y., Yano, T., Sendo, T., Oishi, R. Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 67: 2175-2186 (2004).
- 7) Charatan, F. Bayer decides to withdraw cholesterol lowering drug. *Br. Med. J.*, 323: 359 (2001).
- 8) Shimada, Y., Koga, T., Tabata, F. Partition coefficient and hepatic cell-selectivity of HMG-CoA reductase inhibitors. *Prog. Med.*, 18: 957-962 (1998).
- 9) Folkers, K., Langsjoen, P., Willis, R., Richardson, P., Xia, L.J., Ye, C.Q., Tamagawa, H. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8931-8934 (1990).
- 10) De Pinieux, G., Chariot, P., Ammi-Said, M., Louarn, F., Lejonec, J.L., Astier, A., Jacotot, B., Gherardi, R. Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 42: 333-337 (1996).
- 11) Guijarro, C., Blanco-Colio, L.M., Ortego, M., Alonso, C., Ortiz, A., Plaza, J.J., Diaz, C., Hernandez, G., Egido, J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.*, 83: 490-500 (1998).

- 12) Nakagawa, H., Mutoh, T., Kumano, T., Kuriyama, M. Tyrosine phosphorylation of the catalytic subunit p110 of phosphatidylinositol-3 kinase induced by HMG-CoA reductase inhibitor inhibits its kinase activity in L6 myoblasts. *FEBS Lett.*, 508: 53–56 (2001).
- 13) Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Ferrannini, E., Conte, T., D'Alo, G., Camerino, D.C. Experimental evaluation of the effects of pravastatin on electrophysiological parameters of rat skeletal muscle. *Pharmacol. Toxicol.*, 71: 325-329 (1992).
- 14) Bramow, S., Ott, P., Thomsen Nielsen, F., Bangert, K., Tygstrup, N., Dalhoff, K. Cholestasis and regulation of genes related to drug metabolism and biliary transport in rat liver following treatment with cyclosporine A and sirolimus (Rapamycin). *Pharmacol. Toxicol.*, 89: 133–139 (2001).
- 15) Matzno, S., Tazuya-Murayama, K., Tanaka, H., Yasuda, S., Mishima, M., Uchida, T., Nakabayashi, T., Matsuyama, K. Evaluation of the synergistic adverse effects of concomitant therapy with statins and fibrates on rhabdomyolysis. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55: 795-802 (2003).
- 16) Williams, P.D., Masters, B.G., Evans, L.D., Laska, D.A., Hottendorf, G.H. An in vitro model for assessing muscle irritation due to parenteral antibiotics. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 9:10-17 (1987).
- 17) Knudsen, E.S., Pazzagli, C., Born, T.L., Bertolaet, B.L., Knudsen, K.E., Arden, K.C.,

- Henry, R.R., Feramisco, J.R. Elevated cyclins and cyclin-dependent kinase activity in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cancer Res.*, 58: 2042-2049 (1998).
- 18) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63 (1983).
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
- 20) Hodel, C. Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. *Toxicol. Lett.*, 128: 159–168 (2002).
- 21) Thompson, P.D., Clarkson, P., Karas, R.H. Statin-associated myopathy. *JAMA.*, 289: 1681–1690 (2003).
- 22) Johnson, T.E., Zhang, X., Bleicher, K.B., Dysart, G., Loughlin, A.F., Schaefer, W.H., Umbenhauer, D.R. Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 200: 237–250 (2004).
- 23) Sacher, J., Weigl, L., Werner, M., Szegedi, C., Hohenegger, M. Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314: 1032–1041 (2005).

- 24) Willis, R.A., Folkers, K., Tucker, J.L., Ye, C.Q., Xia L.J., Tamagawa, H. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8928–8930 (1990).
- 25) Ghirlanda, G., Oradei, A., Manto, A., Lippa, S., Uccioli, L., Caputo, S., Greco A.V. Littarru, G.P. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Pharmacol.*, 33: 226–229 (1993).
- 26) Rabkin, S.W. Lovastatin induces cell death in cardiomyocytes that is not reversible by coenzyme Q 10. *Pharmacol. Toxicol.*, 90:343-345 (2002).
- 27) Moghadasian, M.H. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.*, 65: 1329-1337 (1999).
- 28) Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li A.P., Sugiyama, Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 610–616 (2003).
- 29) Neuvonen, P.J., Kantola, T., Kivisto, K.T. Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 63: 332–341 (1998).

- 30) Kantola, T., Kivisto, K.T., Neuvonen, P.J. Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 64: 177–182 (1998).
- 31) Neuvonen, P.J., Jalava, K.M. Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60: 54–61 (1996).
- 32) Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., Tamai, I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306: 703-708 (2003).
- 33) Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y., Sugiyama, Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311: 139–146 (2004).
- 34) Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91: 443-446 (1997).
- 35) Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-1316 (1998).
- 36) Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y. An

- endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.*, 277: 34287-34294 (2002).
- 37) Hirpara, J.L., Clement, M.V., Pervaiz, S. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 514-521 (2001).
- 38) Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q.L., Tsien, R.Y., Reed, J.C. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2: 318-325 (2000).
- 39) Jeong, D., Kim, T.S., Lee, J.W., Kim, K.T., Kim, H.J., Kim, I.H., Kim, I.Y. Blocking of acidosis-mediated apoptosis by a reduction of lactate dehydrogenase activity through antisense mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289: 1141-1149 (2001).
- 40) Boyarsky, G., Ganz, M.B., Sterzel, R.B., Boron, W.F. pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Am. J. Physiol.*, 255: 844-856 (1998).
- 41) Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K. Mechanism of L-lactic acid transport in L6 skeletal muscle cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 19: 363-368 (2004).

- 42) Kobayashi, M., Fujita, I., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K. Transport mechanism for L-lactic acid in human myocytes using human prototypic embryonal rhabdomyosarcoma cell line (RD cells). *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 1197-1201 (2005).
- 43) Tamai, I., Tsuji, A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, 89: 1371-1388 (2000).
- 44) Wu, X., Whitfield, L.R., Stewart, B.H. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm. Res.*, 17: 209-215 (2000).
- 45) Nagasawa, K., Nagai, K., Sumitani, Y., Moriya, Y., Muraki, Y., Takara, K., Ohnishi, N., Yokoyama, T., Fujimoto, S. Monocarboxylate transporter mediates uptake of lovastatin acid in rat cultured mesangial cells. *J. Pharm. Sci.*, 91: 2605-2613 (2002).
- 46) Nagasawa, K., Nagai, K., Ishimoto, A., Fujimoto, S. Transport mechanism for lovastatin acid in bovine kidney NBL-1 cells: kinetic evidences imply involvement of monocarboxylate transporter 4. *Int. J. Pharm.*, 262: 63-73 (2003).
- 47) Kobayashi, M., Otsuka, Y., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K. Inhibitory effects of statins on human monocarboxylate transporter 4. *Int. J. Pharm.*, 317: 19-25 (2006).
- 48) Manning Fox, J.E., Meredith, D., Halestrap, A.P. Characterisation of human



- monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.*, 529: 285-293 (2000).
- 49) Zhong, W.B., Wang C.Y., Chang, T.C., Lee, W.S. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology*, 144: 3852–3859 (2003).
- 50) Halestrap, A.P., Meredith, D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.*, 447: 619-628 (2004).
- 51) Broer, S., Schneider, H.P., Broer, A., Rahman, B., Hamprecht, B., Deitmer, J.W. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.*, 333: 167-174 (1998).
- 52) Lin, R.Y., Vera, J.C., Chaganti, R.S., Golde, D.W. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J. Biol. Chem.*, 273: 28959-28965 (1998).
- 53) Broer, S., Broer, A., Schneider, H.P., Stegen, C., Halestrap, A.P., Deitmer, J.W. Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.*, 341: 529-535 (1999).
- 54) Yoon, H., Fanelli, A., Grollman, E.F., Philp, N.J. Identification of a unique

- monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 90-94 (1997).
- 55) Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., Yamamoto, T. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab. Dispos.*, 33: 1845-1851 (2005).
- 56) Friesema, E.C., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P., Visser, T.J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.*, 278: 40128-40135 (2003).
- 57) Kim, D.K., Kanai, Y., Matsuo, H., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Cha, S.H., Goya, T., Endou, H. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics*, 79: 95-103 (2002).
- 58) Fishbein, W.N., Merezhinskaya, N., Foellmer, J.W. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 26:101-112 (2002).
- 59) Takeda, M., Noshiro, R., Onozato, M.L., Tojo, A., Hasannejad, H., Huang, X.L., Narikawa, S., Endou, H. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, 483: 133-138 (2004).

- 60) Naba, H., Kakinuma, C., Ohnishi, S., Ogihara, T. Improving effect of ethyl eicosapentanoate on statin-induced rhabdomyolysis in Eisai hyperbilirubinemic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340: 215-220 (2006).
- 61) Kobayashi, M., Kaido, F., Kagawa, T., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K. Preventive effects of bicarbonate on cerivastatin-induced apoptosis. *Int. J. Pharm.*, 341:181-188 (2007).
- 62) Kawanishi, K., Tada, S., Kajikawa, T., Ishida, T. Lactate metabolism and lactic acidosis. *Rinsho Byori*, 46: 804-812 (1998).
- 63) Fjellstedt, E., Denneberg, T., Jeppsson, J.O., Tiselius, H.G. A comparison of the effects of potassium citrate and sodium bicarbonate in the alkalization of urine in homozygous cystinuria. *Urol. Res.*, 29: 295-302 (2001).
- 64) Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Ise, T., Murakami, T., Yoshida, T., Nomoto, M., Kohno, K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, 29: 541-549 (2003).
- 65) Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., Morishima, S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.*, 532: 3-16 (2001).

- 66) Friis, M.B., Friborg, C.R., Schneider, L., Nielsen, M.B., Lambert, I.H., Christensen, S.T., Hoffmann, E.K. Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Physiol.*, 567: 427-443 (2005).
- 67) Pierno, S., De Luca, A., Liantonio, A., Camerino, C., Conte Camerino, D. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on excitation-contraction coupling of rat skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 364: 43-48 (1999).
- 68) Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Roselli, A., Natuzzi, F., Ferrannini, E., Laico, M., Camerino, D.C. Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275: 1490-1496 (1995).
- 69) Smith, P.F., Eydeloth, R.S., Grossman, S.J., Stubbs, R.J., Schwartz, M.S., Germershausen, J.I., Vyas, K.P., Kari, P.H., MacDonald, J.S. HMG-CoA reductase inhibitor-induced myopathy in the rat: cyclosporine A interaction and mechanism studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 1225-1235 (1991).
- 70) Nakahara, K., Kuriyama, M., Sonoda, Y., Yoshidome, H., Nakagawa, H., Fujiyama, J., Higuchi, I., Osame, M. Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: a pathological, electrophysiological, and biochemical study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152: 99-106 (1998).

71) Waclawik, A.J., Lindal, S., Engel, A.G. Experimental lovastatin myopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 52: 542–549 (1993).

72) Neale, R., Reynolds, T.M., Saweirs, W. Statin precipitated lactic acidosis? *J. Clin. Pathol.*, 57: 989-90 (2004).

## 謝辞

本研究を行うにあたり終始変わらぬ御指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 井関 健教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の副査として御審査を賜りました北海道大学大学院薬学研究院生物物理化学研究室 加茂 直樹教授、同研究室 宮内 正二准教授ならびに薬物動態解析学研究室 菅原 満准教授に深く感謝致します。

さらに多くの有益な御助言、御指導を戴きました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 平野 剛講師ならびに板垣 史郎助教に深謝致します。

本研究の実施にあたり種々の検討にご協力いただきました藤田 到修士、海藤 文恵学士、香川 俊樹学士、鳴海 克哉学士、知寄 郁美学士、日高和宏学士に深く感謝いたします。

また平素の研究のみならず、あらゆる面で支えていただいた臨床薬剤学研究室のすべての方々に心から感謝致します。

最後に、長い間いつも支えてくれた友人と家族の皆様に深く感謝の意を表します。

小林 正紀